



# **Università degli Studi di Cagliari**

## **DOTTORATO DI RICERCA NEUROSCIENZE**

**Ciclo XXVIII**

**TITOLO TESI**

### **ALTERAZIONI INDOTTE DALL'ISOLAMENTO SOCIALE SULLA REGOLAZIONE A FEEDBACK NEGATIVO DELL'ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-SURRENE**

**Settore scientifico-disciplinare di afferenza**

**BIO14**

**Presentata da:**

**Dott.ssa BOERO GIORGIA**

**Coordinatore Dottorato:**

**Prof. FRATTA WALTER**

**Tutor:**

**Prof.ssa SERRA MARIANGELA**

**Esame finale anno accademico 2014 – 2015**



## Sommario

Capitolo 1. Introduzione.....	1
1.1 Lo stress.....	1
1.2 Neurofisiologia dello stress e asse ipotalamo-ipofisi-surrene (IIS) .....	5
1.3 Steroidi neuroattivi e recettore GABA <sub>A</sub> .....	12
1.4 Il feedback negativo dell'asse IIS.....	17
1.5 L'isolamento sociale.....	27
1.6 Obiettivo della tesi.....	32
Capitolo 2. Materiali e metodi.....	34
2.1 Animali.....	34
2.2 Isolamento sociale .....	35
2.3 Foot-shock stress .....	35
2.4 Western blot.....	36
2.5 Trattamento con mifepristone (RU486) .....	38
2.6 Misurazione del corticosterone.....	39
2.7 Estrazione e misurazione degli endocannabinoidi .....	39
2.8 Misurazione dell'allopregnanolone .....	40
2.9 Analisi statistica.....	41
Capitolo 3. Risultati.....	42
3.1 Effetto dell'isolamento sociale sui livelli plasmatici basali di corticosterone .....	42
3.2 Effetto del foot-shock stress sui livelli plasmatici di corticosterone dei ratti socialmente isolati .....	44
3.3 Effetto dell'esposizione a due stress consecutivi sulla risposta dell'asse IIS dei ratti socialmente isolati.....	45
3.4 Effetto dell'isolamento sociale e dello stress acuto sui livelli ipotalamici dell'ormone di rilascio per la corticotropina (CRH) .....	46
3.5 Effetto dell'isolamento sociale e del foot-shock stress sull'espressione ippocampale e ipotalamica dei recettori per i glucocorticoidi (GR) .....	48
3.6 Effetto del trattamento con Mifepristone (RU486) e dello stress acuto sui livelli plasmatici di corticosterone in animali di controllo .....	51
3.7 Effetto dell'isolamento sociale sull'espressione delle subunità alfa4 e delta del recettore GABA <sub>A</sub> nell'ipotalamo.....	53
3.8 Effetto del foot-shock stress sui livelli plasmatici di allopregnanolone dei ratti socialmente isolati .....	54
3.9 Effetto dell'isolamento sociale e dello stress acuto sul sistema endocannabinoide.....	56
Capitolo 4. Discussione.....	59
Capitolo 5. Bibliografia.....	66

# Capitolo 1.

## Introduzione

### 1.1 Lo stress

Lo stress è una reazione di adattamento che un organismo mette in atto per ripristinare l'omeostasi. La prima definizione di stress fu data dall'endocrinologo ungherese Hans Selye nel 1936. Egli notò come pazienti che soffrivano di differenti disturbi mostravano segni e sintomi molto simili. Partendo da queste osservazioni, cercò di replicare le stesse condizioni in animali da laboratorio sottoponendoli a diversi stimoli negativi, fisici e psicologici, e osservò che tutti gli animali, indipendentemente da quello a cui erano stati sottoposti, rispondevano con una reazione fisiologica molto simile, caratterizzata dall'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (IIS) e dalla conseguente produzione di glucocorticoidi. Questi esperimenti portarono il medico ungherese a definire lo stress come “una risposta non-specifica che l'organismo mette in atto in seguito a qualsiasi richiesta di cambiamento” (*Selye, 1956*).

Il mantenimento dell'omeostasi in presenza di stimoli avversi (definiti “stressors”) richiede l'attivazione di una complessa serie di meccanismi che coinvolgono il sistema endocrino, nervoso ed immunitario; complessivamente l'attivazione di tutti questi sistemi viene chiamata “risposta allo stress” e include modificazioni comportamentali (aumento di vigilanza, allerta e attenzione), vegetative (aumento dell'attività cardiaca, della frequenza respiratoria, diminuzione dell'attività dei sistemi gastro-intestinale, urinario, riproduttivo, etc.) ed endocrine (produzione di corticosteroidi e catecolamine che aumentano la resistenza e migliorano le prestazioni) atte ad aumentare le possibilità dell'organismo a sopravvivere (*Chrousos e Gold, 1992; Sapolsky et al., 2000; Habib et al., 2001; Carrasco*

e Van de Kar, 2003; Charmandari, 2005). Lo stress rappresenta quindi una risposta adattativa a tutta una serie di stimoli esterni che colpiscono il nostro organismo e tendono ad alterarne il suo normale equilibrio omeostatico. L'organismo, sottoposto ad uno o più stimoli stressanti, mette in atto, in brevi tempi, tutta una serie di risposte fisiche e neurochimiche al fine di ristabilire l'equilibrio perturbato. Per questo motivo, nonostante il termine stress assuma nel linguaggio comune un significato prettamente negativo, in quanto sinonimo di malessere fisico e psicologico, in realtà uno stimolo stressante di bassa intensità o di breve durata può attivare nell'individuo risposte di natura positiva, rendendolo capace di affrontare situazioni che richiedono una elevata concentrazione ed un certo grado di impegno, sia fisico che mentale.

La reazione che l'organismo mette in atto per rispondere allo stress è descritta dalla "General Adaptation Syndrome" (G.A.S.) o "sindrome generale di adattamento", detta anche "sindrome da stress", che Hans Selye delineò e pubblicò in un lavoro sul *British Journal Nature*. Secondo questi studi la G.A.S. racchiude un insieme di meccanismi che si attivano nel momento in cui siamo sottoposti a stimoli nocivi, e si articola in tre fasi differenti:

- Fase di allarme: l'organismo viene a contatto con lo stimolo stressante; la risposta in questo caso è del tipo "fight or flight", che comporta l'immediata produzione di ormoni quali cortisolo e adrenalina per permettere una prima tempestiva risposta. Importante è inoltre il coinvolgimento del glucosio, oltre che un aumento della pressione arteriosa e della frequenza respiratoria, che consentono al corpo di restare in una condizione di allarme.
- Fase di resistenza: l'organismo tenta di contrastare gli effetti negativi dello stress prolungato, producendo risposte specifiche a livello ormonale/endocrino, con un coinvolgimento delle ghiandole surrenali.

- Fase di esaurimento: se lo stimolo stressante persiste, l'individuo può venirne sopraffatto, con produzione di effetti spiacevoli permanenti a carico della struttura psichica e/o somatica.

Una risposta ottimale è caratterizzata da condizioni che producono un'attivazione e disattivazione rapida dei sistemi biologici, da una sincronia nelle risposte biologiche e comportamentali, e da un'intensità variabile in rapporto alla risposta individuale. Le deviazioni dalle caratteristiche ideali di questa risposta di stress ottimale possono essere molteplici.

Lo stress, a seconda della sua durata temporale, può essere suddiviso in due tipologie:

- Stress acuto, di breve durata e di elevata intensità: è possibile che nella prima fase della risposta generale di adattamento alcune manifestazioni delle reazioni di stress in condizioni acute e particolarmente intense possano essere alla base di reazioni amplificate fino a patologiche.
- Stress cronico, la cui durata comprende un lungo arco temporale e di intensità non necessariamente elevata: giorni, settimane o mesi. L'esposizione allo stress prosegue quindi nel tempo al di là delle possibilità di reazione dell'organismo. Lo stress cronico può a sua volta essere suddiviso in intermittente (a intervalli regolari e di durata limitata) e persistente (continuativo).

Lo stress e le risposte ad esso associate sono ampiamente studiate ai giorni nostri. Diverse evidenze hanno dimostrato come l'esposizione a stimoli stressanti, derivanti dall'ambiente familiare, sociale e lavorativo, che l'organismo non riesce a contrastare, porti l'individuo ad essere sempre più vulnerabile verso lo sviluppo di patologie sia di natura fisica che psicologica, come depressione e ansia.

Assume quindi particolare rilevanza il momento della vita in cui si subisce lo stress: il periodo prenatale, l'infanzia e l'adolescenza sono periodi di grande plasticità neuronale in

cui il cervello è particolarmente suscettibile ai fattori ambientali (*Greenough et al., 1987; O'Leary et al., 1995*). L'esposizione ad eventi stressanti durante questi intervalli di tempo può causare alterazioni neuroendocrine e metaboliche che permangono per tutta la vita. È stato dimostrato che gli stress che la madre subisce durante la gravidanza hanno profondi effetti sulle funzioni cognitive, sullo sviluppo dello stato emozionale e sulle risposte allo stress nella vita adulta del nascituro, sia negli animali che negli uomini (*Heim e Nemeroff, 2001; Lupien et al., 2009; Veenema, 2009*). Questi cambiamenti sono ricollegati all'aumento della secrezione di glucocorticoidi nella madre stressata che oltrepassano la placenta e raggiungono il feto (*Cottrell e Seckl, 2009*).

Lo stress può avere effetti negativi non solo durante gravidanza. Infatti, situazioni stressanti vissute durante l'infanzia e l'adolescenza possono interferire con il corretto sviluppo e con la maturazione del sistema nervoso centrale (*Levine, 1967; Heim e Nemeroff, 2002*). Ci sono evidenze di come il volume cerebrale di bambini cresciuti in un ambiente ostile come un orfanotrofio sia ridotto rispetto a quello di bambini cresciuti in famiglie amorevoli. O ancora, l'uso di sostanze d'abuso (nicotina, cannabis, alcool, cocaina) durante l'adolescenza è stato correlato all'insorgenza di malattie psichiatriche in età adulta.

Quindi, la durata e il periodo della vita durante il quale le esperienze stressanti vengono vissute sono estremamente importanti per la corretta organizzazione neurale e interferenze durante questi delicati processi possono aumentare la probabilità di sviluppo di disordini mentali quali schizofrenia, depressione maggiore e altri disturbi dell'umore (*Russo et al., 2012*).

## 1.2 Neurofisiologia dello stress e asse ipotalamo-ipofisi-surrene (IIS)

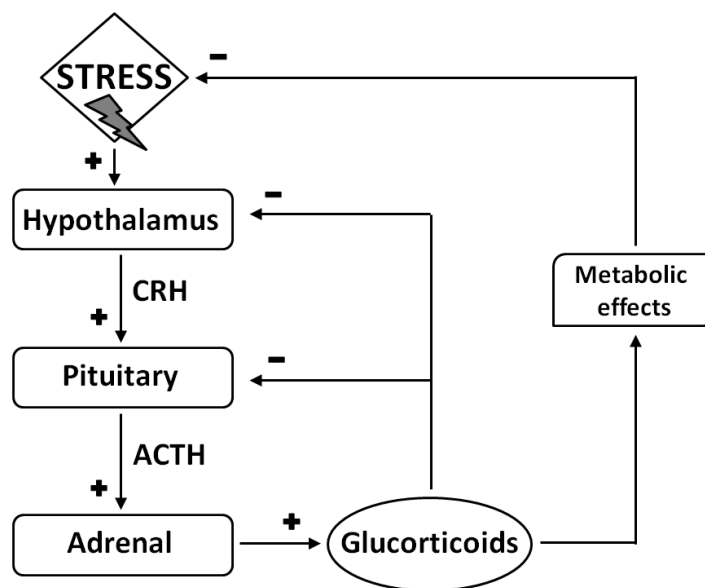
La risposta allo stress viene mediata da differenti strutture anatomiche localizzate sia nel sistema nervoso centrale che nei tessuti periferici. La centrale di controllo della risposta allo stress è rappresentata dall'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (IIS), un insieme di strutture che includono il nucleo paraventricolare dell'ipotalamo, il lobo anteriore dell'ipofisi e le ghiandole surrenali. L'asse IIS rappresenta il principale coordinatore delle risposte, sia metaboliche che comportamentali, dell'organismo a differenti situazioni stressanti. Questo sistema neuroendocrino stress-reattivo aiuta l'organismo ad adattarsi a maggiori richieste e a mantenere l'omeostasi dopo lo sforzo, ma è anche di vitale importanza per sostenere il normale funzionamento fisiologico. Il prodotto finale di questo processo nell'uomo è il cortisolo, che ha una vasta gamma di effetti fisiologici nel corpo; potenzialmente ogni singola cellula nucleata del corpo potrebbe essere un bersaglio per il cortisolo. Il cortisolo gioca un ruolo fondamentale nel metabolismo, mobilitando risorse per fornire energie. Questo aiuta a superare l'aumento della domanda metabolica in seguito a sfide più difficili da affrontare. Esso regola o impatta su altri importanti sistemi fisiologici, come il sistema immunitario, l'asse simpatico-surrenale-midollare, il sistema cardio-vascolare, nonché processi affettivi e cognitivi.

In seguito allo stress, dai centri nervosi superiori partono segnali che raggiungono le cellule neuroendocrine del nucleo paraventricolare dell'ipotalamo stimolando la produzione e il rilascio nel circolo portale ipofisario dell'ormone di rilascio delle corticotropine (corticotropin-releasing hormone, CRH), il principale regolatore dell'asse IIS (*Vale et al., 1981; Rivier et al., 1983*).

Il CRH rilasciato nel circolo raggiunge l'adenoipofisi (o ipofisi anteriore) e, agendo sulle cellule corticotrope attraverso il legame con specifici recettori, promuove il rilascio di



ACTH (ormone adrenocorticotropo); una volta liberato nel circolo sistemico, l'ACTH raggiunge la zona corticale dei surreni dove regola la sintesi e la secrezione degli ormoni corticosurrenali, glucocorticoidi e mineralcorticoidi (Owens *et al.*, 1991). Questi sono gli ormoni che regolano i cambiamenti fisiologici richiesti in risposta allo stress attraverso il legame coi loro recettori, GR (recettori per i glucocorticoidi) ed MR (recettori per i mineralcorticoidi) (Munck *et al.*, 1984; Bamberger *et al.*, 1996); presentano inoltre un meccanismo di autocontrollo che permette di mantenere costante la loro concentrazione a livello fisiologico. Infatti, una volta immessi nel circolo sanguigno, esercitano un meccanismo a feedback negativo agendo a livello dell'ippocampo, dell'ipotalamo e dell'ipofisi e inibendo l'ulteriore produzione di CRH e ACTH (Figura 1).



**Figura 1.** Schema rappresentativo dell'attivazione dell'asse HHS. In seguito a stimoli provenienti dai centri superiori, l'ipotalamo secerne l'ormone di rilascio delle corticotropine (CRH). Esso, agendo sull'adenoipofisi, promuove il rilascio dell'ACTH (ormone adrenocorticotropo), il quale stimola la produzione e il rilascio di glucocorticoidi da parte della corticale del surrene. I glucocorticoidi, agendo tramite un sistema a feedback negativo, vanno ad inibire il rilascio di corticotropine da parte dell'ipofisi anteriore, l'ulteriore rilascio di CRH da parte del nucleo paraventricolare dell'ipotalamo e, infine, la risposta allo stress.

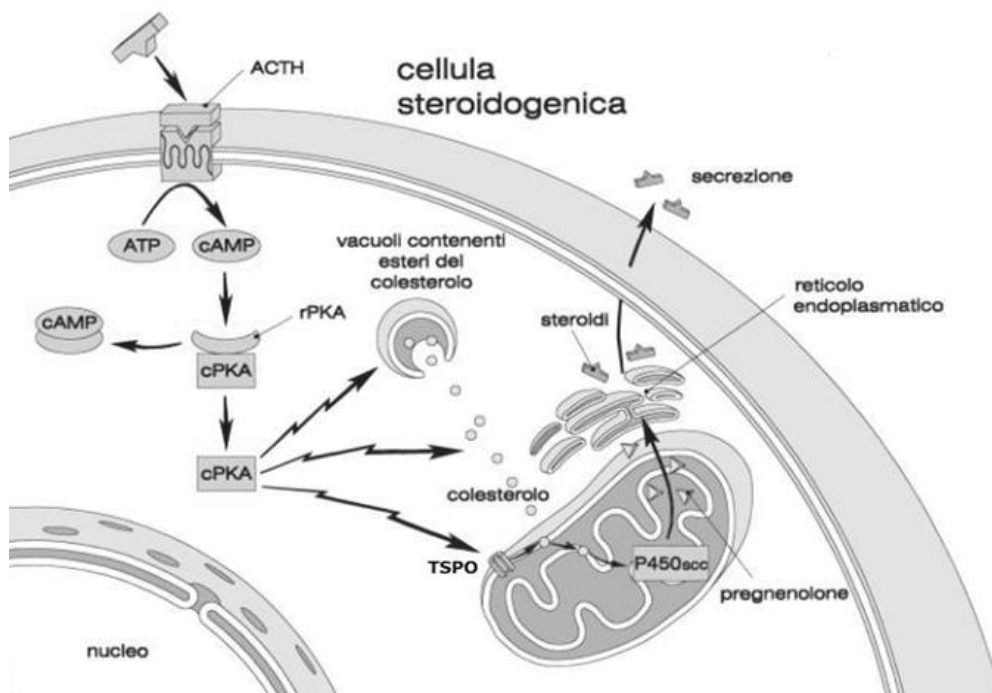
Il CRH è un peptide di 41 amminoacidi, principalmente prodotto dai neuroni parvocellulari del nucleo paraventricolare dell'ipotalamo e modula la risposta periferica allo stress

portando alla sintesi di glucocorticoidi e mineralcorticoidi; inoltre regola le risposte comportamentali e autonome allo stress con la sua azione a carico di diversi nuclei encefalici. Fino ad ora sono stati identificati due principali recettori a cui si lega: il recettore di tipo 1 (CRH-R1) e il recettore di tipo 2 (CRH-R2) (*Chen et al., 1993; Lovemberg et al., 1995; Kishimoto et al., 1995*). Tali recettori appartengono alla famiglia dei recettori a 7 passi transmembrana, accoppiati alla trasduzione del segnale cAMP-PKA (*Grigoriadis et al., 1996*). Il CRH-R1 è particolarmente espresso a livello ipofisario e corticale (soprattutto a carico della neocorteccia) e media prevalentemente le risposte e l'azione dell'asse IIS, a differenza dell'isoforma CRH-R2 che ritroviamo più abbondante in periferia. Quest'ultimo è particolarmente espresso in organi quali cuore, muscolatura scheletrica e tratto gastro-intestinale (*Kishimoto et al., 1995; Lovemberg et al., 1995*), nonostante sia presente in aree cerebrali quali ipotalamo ventromediale e nuclei del setto. I due tipi di recettori a cui si lega il CRH esplicano effetti opposti sulla regolazione dello stato ansioso: l'attivazione del CRH-R1 media l'effetto ansiolitico, mentre l'attivazione del CRH-R2 media l'effetto ansiogenico (*Kishimoto et al., 2000*).

Il CRH è responsabile della secrezione, da parte delle cellule basofile dell'adenoipofisi, dell'ACTH, un peptide di 39 amminoacidi derivante dalla proopiomelanocortina (POMC). Questa molecola, la cui porzione ammino-terminale è la responsabile della sua attività biologica, agisce sulle ghiandole surrenali, sulle quali sono localizzati i suoi recettori specifici. Questi sono recettori per la melanocortina di tipo 2 (MC2R), membri della famiglia delle rodopsine, recettori a 7 passi transmembrana accoppiati a proteine G, localizzati nelle cellule parenchimali della zona fascicolata della corticale del surrene. Il legame dell'ACTH coi recettori MC2R porta ad un aumento dei livelli di cAMP, con conseguente attivazione di protein-chinasi che determinano la liberazione degli ester del colesterolo, favorendo così la steroidogenesi e pertanto la formazione e secrezione di

glucocorticoidi, mineralcorticoidi e steroidi androgeni derivanti dalla via biosintetica del colesterolo (*Mountjoy et al., 1992; Cone et al., 1996*).

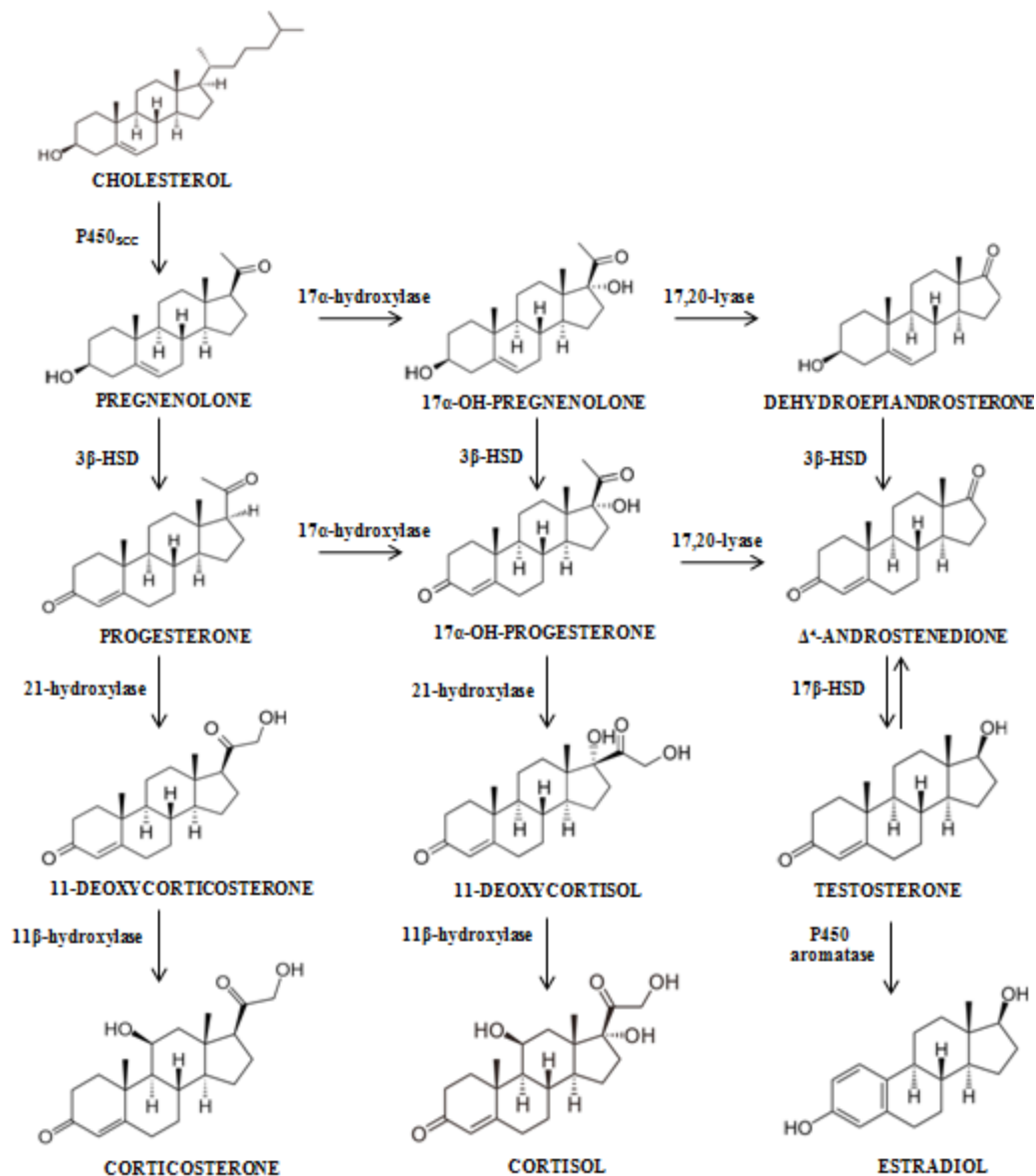
La via biosintetica che porta alla sintesi degli steroidi richiede come primo evento la traslocazione del colesterolo dalla membrana esterna mitocondriale a quella interna e questo passaggio rappresenta la tappa limitante della sintesi degli steroidi. La regolazione di questo trasporto è mediata dall'attivazione della "Translocator protein" (TSPO). Il legame dell'ACTH con i recettori surrenalici comporta un incremento intracellulare di adenosina monofosfato ciclico (cAMP); tale incremento determina l'attivazione del peptide DBI (Diazepam Binding Inibitor). Il DBI attiva il TSPO permettendo l'ingresso del colesterolo nel mitocondrio (Figura 2).



**Figura 2.** Regolazione e siti cellulari della steroidogenesi.

E' stato proposto che nel trasferimento del colesterolo all'interno del mitocondrio eserciti un ruolo importante la Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR). Questa è una

proteina di 30 kDa localizzata nella membrana mitocondriale esterna, la cui estremità C-terminale contiene un dominio idrofobico che potrebbe essere implicato nel legame con il colesterolo sul lato citoplasmatico. La proteina StAR viene contemporaneamente clivata da una proteasi specifica e la parte restante penetra nel mitocondrio bloccando l'ulteriore passaggio di colesterolo e di conseguenza l'ulteriore sintesi di steroidi.



**Figura 3.** Rappresentazione grafica della steroidogenesi a partire dal colesterolo.

La via biosintetica degli ormoni steroidei parte dal colesterolo (Figura 3) (*Mellon et al., 2001*), il quale è trasportato all'interno del mitocondrio dove viene convertito in pregnenolone dal citocromo P450.

Il colesterolo, una volta trasportato all'interno del mitocondrio, viene convertito in pregnenolone (PRE) attraverso una reazione catalizzata dal citocromo P450<sub>scc</sub> che scinde la catena laterale del carbonio 20 del colesterolo. Il PRE migra dai mitocondri al reticolo endoplasmatico e può essere convertito, attraverso due diverse vie biosintetiche, in:

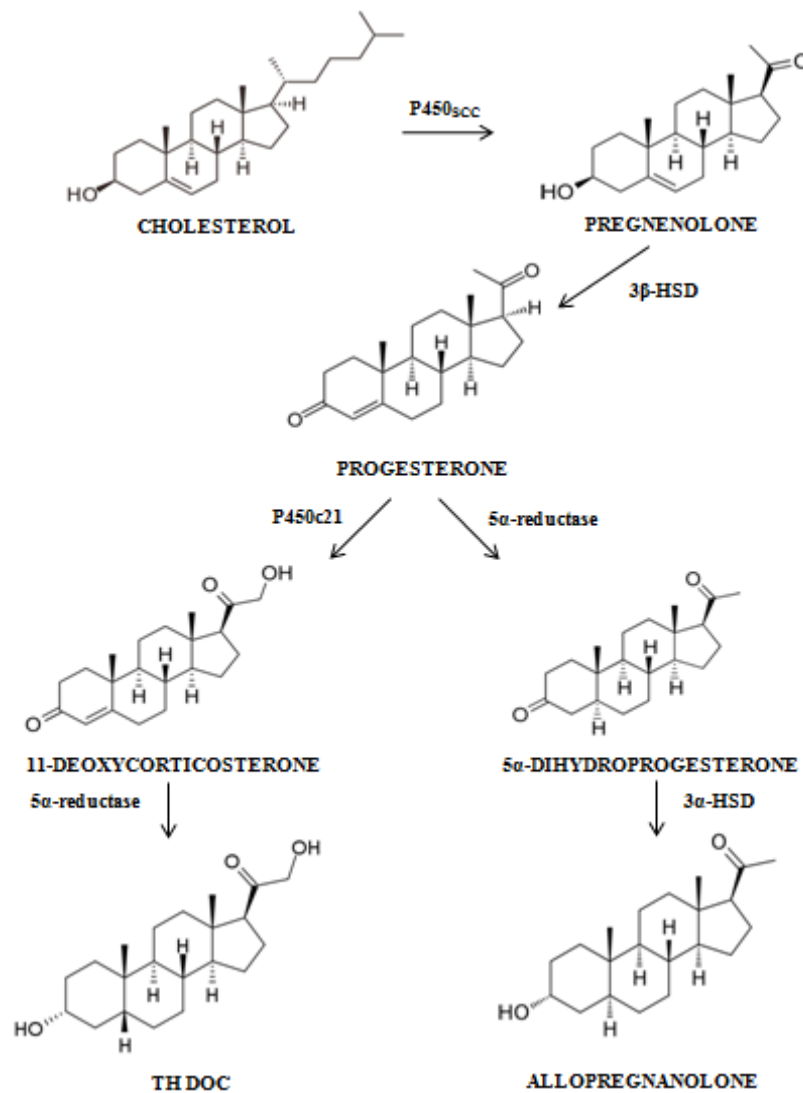
- Progesterone (PROG), mediante l'azione dell'enzima 3 $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi (3 $\beta$ -HSD), il quale, a sua volta, viene metabolizzato in corticosterone (CTS) attraverso l'azione di due enzimi, il primo rappresentato dalla 21-idrossilasi (CYP21A2) ed il secondo dalla 11 $\beta$ -idrolasi (CYP11B1);
- 17 $\alpha$ -idrossipregnenolone, mediante l'azione dell'enzima 17 $\alpha$ -idrossilasi (CYP17A1), che viene poi metabolizzato in cortisolo attraverso la formazione di due intermedi, il 17 $\alpha$ -idrossiprogesterone (tramite l'enzima CYP17A1) ed il deossicortisolo (tramite l'enzima CYP11B1).

Il 17 $\alpha$ -idrossipregnenolone può essere a sua volta metabolizzato, attraverso l'azione di una liasi (CYP17A1), in deidroepiandrosterone (DHEA), il quale viene metabolizzato in  $\Delta^4$ -androstenedione (CYP17A1) e successivamente in testosterone attraverso la 17 $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi (17 $\beta$ -HSD). Quest'ultimo può essere convertito in estradiolo attraverso l'azione di un'aromatasi (CYP19A1).

Il progesterone può essere inoltre convertito in:

- 5 $\alpha$ -diidroprogesterone (5 $\alpha$ -pregnan-20-one o 5 $\alpha$ -DHP) dall'enzima 5 $\alpha$ -reduttasi, il quale, attraverso l'enzima 3 $\alpha$ -idrossisteroide deidrogenasi (3 $\alpha$ -HSD) si trasforma in allopregnanolone (3 $\alpha$ -idrossi-5 $\alpha$ -pregnan-20-one o AP);

- 11-deossicorticosterone (DOC) per azione dell'enzima P450c21, il quale viene successivamente convertito in diidrodossicorticosterone (DHDOC) dalla 5 $\alpha$ -reduttasi ed infine in tetraidrodossicorticosterone (5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ ,21-diol-20-one o THDOC) ad opera della 3 $\alpha$ -HSD (Figura 4).



*Figura 4. Biosintesi degli steroidi neuroattivi.*

Queste due vie metaboliche portano alla formazione di quelli che vengono chiamati steroidi neuroattivi, modulatori allosterici positivi del recettore GABA<sub>A</sub>.

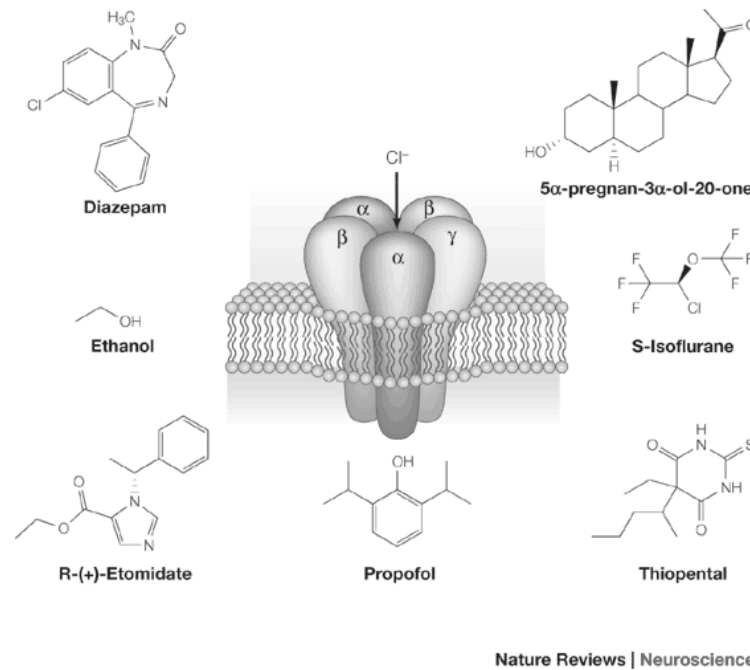
### 1.3 Steroidi neuroattivi e recettore GABA<sub>A</sub>

I due metaboliti del progesterone, AP e THDOC, sono tra i più potenti ed efficaci modulatori allosterici positivi endogeni del recettore GABA<sub>A</sub>, in quanto facilitano l'interazione tra l'acido  $\gamma$ -amminobutirrico (GABA) e le benzodiazepine ai loro siti di legame sul recettore, potenziando la corrente al cloro (Cl<sup>-</sup>) e conseguentemente la trasmissione GABAergica (*Majewska et al., 1986*). L'evidenza che i neurosteroidi hanno la capacità di attivare il recettore GABA<sub>A</sub>, sia potenziando il legame del GABA (*Harrison et al., 1987*) sia, a dosi più alte, andando ad aprire direttamente il canale (*Puia et al., 1990*), dimostra come questi composti giochino un ruolo cruciale nella modulazione della soglia dell'eccitabilità neuronale e in molte funzioni cerebrali.

La somministrazione sistemica o intracerebroventricolare di dosi farmacologiche di AP e THDOC induce un effetto ansiolitico, anticonvulsivante, ipnotico, sedativo e miorilassante, visibile sia nell'uomo che nell'animale (*Majewska et al., 1986, 1992; Harrison et al., 1987; Lambert et al., 1995*).

La velocità con la quale insorgono questi effetti suggerisce che siano mediati da un'azione diretta di questi ormoni su specifici recettori di membrana escludendo un meccanismo genomico.

Il recettore GABA<sub>A</sub> (Figura 5) è un eteropentamero facente parte della famiglia dei recettori inotropici di tipo A che include il recettore per la glicina, il recettore nicotinico per l'acetilcolina e il recettore 5-HT<sub>3</sub> per la serotonina; in particolare il recettore GABA<sub>A</sub> è associato ad un canale permeabile allo ione cloro e regola la maggior parte della neurotrasmissione inibitoria del cervello.



**Figura 5.** Rappresentazione schematica del recettore GABA<sub>A</sub> (Belelli e Lambert, 2005)

Si conoscono 19 tipi di subunità che presentano circa il 30-40% di omologia nella loro sequenza amminoacidica (Seeburg *et al.*, 1990) e vengono divise in 8 classi denominate con le lettere dell'alfabeto greco: α (sei isoforme), β (tre isoforme), γ (tre isoforme), δ, ε, π, ρ, Θ (tre isoforme). La combinazione di queste subunità porta alla formazione di diversi recettori GABA<sub>A</sub> aventi profili farmacologici diversi e localizzazione cerebrale differente. Negli ultimi 20 anni è stata dimostrata la presenza, all'interno dello stesso neurone, di due popolazioni distinte di recettori GABA<sub>A</sub>, localizzate a livello sinaptico ed extrasinaptico. L'attivazione transiente dei recettori GABA<sub>A</sub> sinaptici è responsabile della tipica inibizione fasica mediata dal GABA, mentre l'attivazione continua dei recettori GABA<sub>A</sub> extrasinaptici media un'inibizione di tipo tonico (Brickley *et al.*, 1996; Mody, 2001; Hamann *et al.*, 2002; Nusser e Mody, 2002; Semyanov *et al.*, 2003, 2004). Questi due tipi di recettori si differiscono, oltre che per le correnti da essi mediate, anche per la loro composizione: infatti alcune subunità sono caratteristiche dei recettori sinaptici, come la γ (Essrich *et al.*, 1998), mentre altre si trovano assemblate solo nei recettori extrasinaptici,



come la  $\delta$  (Nusser *et al.*, 1998). I recettori extrasinaptici contenenti la subunità  $\delta$  possiedono un'affinità per il GABA circa 50 volte maggiore rispetto ai recettori che non la contengono (Saxena e Macdonald 1996; Brown *et al.*, 2002); possono quindi essere attivati da minime quantità di neurotrasmettitore che fuoriescono dalle sinapsi e non vengono ricaptate dai trasportatori, determinando così l'inibizione tonica mediata da questi recettori. I recettori GABA<sub>A</sub> extrasinaptici presentano inoltre una maggiore sensibilità agli steroidi neuroattivi come l'AP (Morrow *et al.*, 1990) e all'etanolo (Sundstrom-Poromaa *et al.*, 2002; Wallner *et al.*, 2003), rispetto ai recettori contenenti la subunità  $\gamma$ .

Nel sistema nervoso dei mammiferi la maggior parte dei recettori GABA<sub>A</sub> è costituita dalla combinazione di due subunità  $\alpha$  e due subunità  $\beta$  che si assemblano assieme ad una subunità  $\delta$  o ad una  $\gamma$  per formare il pentamero.

L'AP, quindi, facilita l'interazione del GABA e delle benzodiazepine con i loro siti di legame (Majewska *et al.*, 1986), inducendo una modificazione allosterica del recettore GABA<sub>A</sub> con conseguente potenziamento della trasmissione GABAergica (Puia *et al.*, 1990; Lambert *et al.*, 1995).

Studi recenti hanno identificato due specifici siti di legame per gli steroidi a livello del complesso recettoriale GABA<sub>A</sub>. Il primo, localizzato sulla subunità  $\alpha$ , media la capacità degli steroidi di potenziare l'attività dello ionoforo Cl<sup>-</sup> attraverso una facilitazione allosterica dell'azione del GABA; il secondo, localizzato in corrispondenza delle regioni di interfaccia tra la subunità  $\alpha$  e quella  $\beta$ , quando viene attivato, modula direttamente la funzione del canale del cloro (Hosie *et al.*, 2006).

Una scoperta fondamentale per capire il ruolo fisiologico degli ormoni steroidei è data dall'evidenza che, nel cervello, alcune cellule gliali (soprattutto gli oligodendrociti) sono capaci di sintetizzare steroidi "ex novo" a partire dal colesterolo, e i neuroni di metabolizzare precursori (pregnanolone, progesterone) che provengono dalla periferia. La

dimostrazione che il sistema nervoso centrale (SNC) sintetizza steroidi e contiene a livello di membrana “bersagli” funzionali per una rapida azione di questi ormoni, ha aperto un nuovo entusiasmante capitolo nello studio della farmacologia degli ormoni steroidei e della funzione dei recettori GABA<sub>A</sub>. Questi ormoni sarebbero una componente fondamentale dei meccanismi fisiologici rilevanti nel controllo dell'attività delle aree cerebrali coinvolte nella regolazione delle emozioni e più in generale dell'eccitabilità neuronale.

E' importante sottolineare che l'AP è capace inoltre di modulare la trascrizione dei geni per le subunità del recettore GABA<sub>A</sub> (Follesa *et al.*, 1998, 2004; Concas *et al.*, 1998). Infatti, le fluttuazioni fisiologiche di AP durante il ciclo mestruale, la gravidanza e la menopausa, inducono variazioni nella struttura e nella funzione del recettore GABA<sub>A</sub> (Follesa *et al.*, 1998, 2004; Concas *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998; Fenelon e Herbison, 1996). Pertanto, alterazioni nella regolazione della secrezione periferica e centrale di questi ormoni, alterando il pattern di espressione del recettore GABA<sub>A</sub>, modificano la soglia di eccitabilità delle cellule.

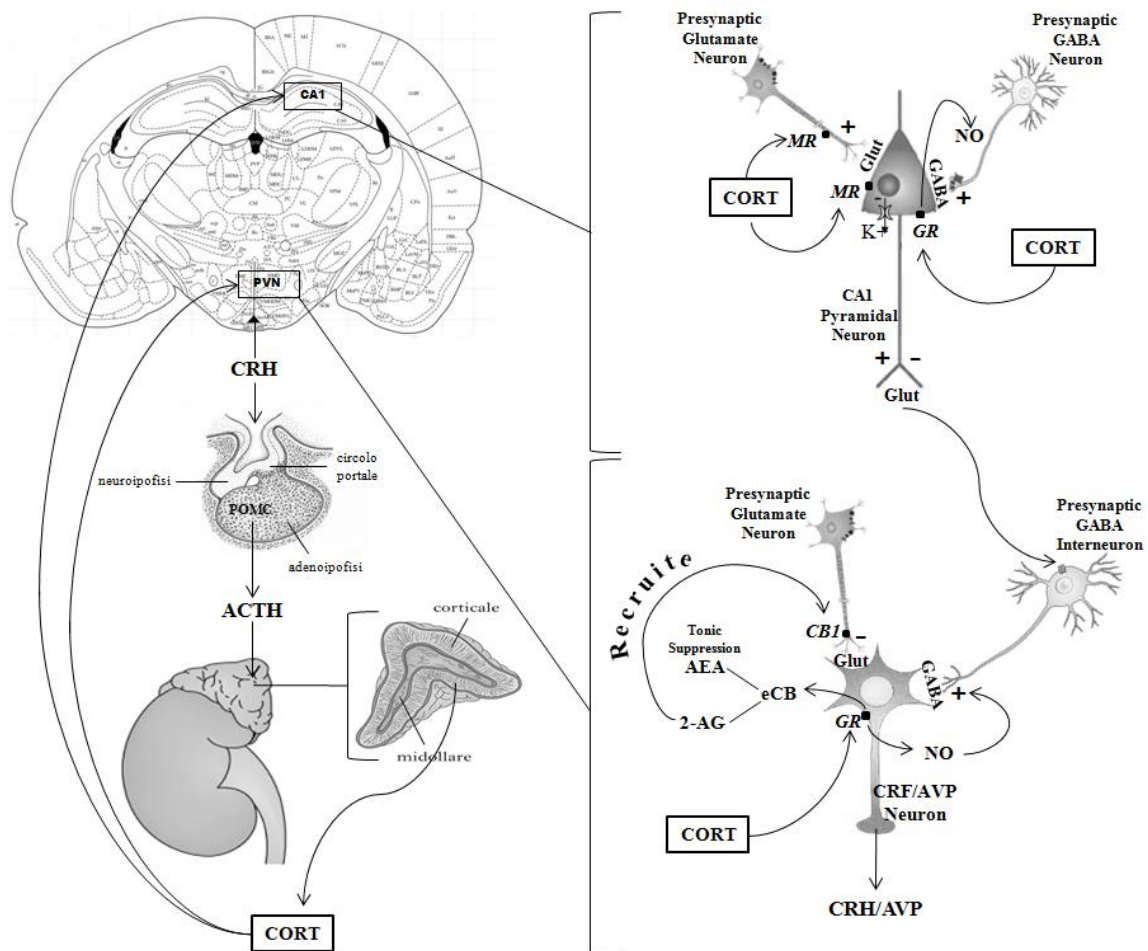
Diversi studi hanno dimostrato che le concentrazioni plasmatiche e cerebrali di AP e THDOC sono modificate in alcuni modelli sperimentali di stress acuto. E' stato visto che l'esposizione degli animali a stimoli stressanti come il foot-shock, l'inalazione di anidride carbonica (CO<sub>2</sub>), il nuoto forzato e la stessa manipolazione precedente al sacrificio, inducono un rapido aumento delle concentrazioni plasmatiche e cerebrali di steroidi neuroattivi (Purdy *et al.*, 1991; Barbaccia *et al.*, 1996, 1997). Questo effetto è simile a quello dei farmaci ansiogenici come le  $\beta$ -carboline, composti alcaloidi che modulano negativamente il recettore GABA, o come l'isoniazide, un inibitore della sintesi del GABA (Horton *et al.*, 1979), che riducono la trasmissione GABAergica inducendo uno stato d'ansia sia nell'animale che nell'uomo (Barbaccia *et al.*, 1996).

Il meccanismo attraverso cui lo stress determina l'aumento della concentrazione plasmatica e cerebrale di AP e THDOC è mediato dall'attivazione dell'IIS. È stato dimostrato che in animali castrati e surrenectomizzati, cioè privati dei principali organi steroidogenici periferici, il foot-shock non è in grado di modificare le concentrazioni cerebrali di AP e THDOC (*Barbaccia et al., 1997*). Negli ultimi anni inoltre, è stato dimostrato il coinvolgimento dell'AP nella regolazione del feedback negativo dell'asse IIS, attraverso l'interazione coi recettori GABA<sub>A</sub> presenti in ippocampo e ipotalamo (*Gunn et al., 2015; Brunton, 2015; Biggio et al., 2014; 2007*).

## 1.4 Il feedback negativo dell'asse IIS

Il corticosterone (analogo del cortisolo nell'uomo), in virtù delle modificazioni metaboliche, comportamentali e cardiovascolari che produce è universalmente riconosciuto come "l'ormone dello stress" (*Ice, 2005*). È un ormone steroideo a 21 atomi di carbonio prodotto dalle ghiandole surrenali a livello della corteccia, ed è il principale glucocorticoide coinvolto nelle reazioni metaboliche, immuni, e nella risposta allo stress. Una delle funzioni principali esercitate dai glucocorticoidi è lo spegnimento della risposta neuroendocrina allo stress e dunque la regolazione del feedback negativo dell'asse IIS. Tipicamente, i glucocorticoidi circolano sia verso l'ippocampo e l'ipotalamo sia verso l'ipofisi, dove agiscono tramite specifici recettori per inibire la produzione e la secrezione sia del proprio ormone ipotalamico di rilascio (CRH) sia dell'ormone ipofisario di regolazione (ACTH). Tale risposta ormonale, che si verifica anche nella normale situazione fisiologica, ripristina l'omeostasi e spegne il segnale che l'ha attivata inibendo la secrezione dei relativi ormoni ipotalamici ed ipofisari. Si viene così a creare una sorta di circuito fisiologico, dove il prodotto finale di una determinata via metabolica inibisce la prima tappa della stessa via che l'ha generato. Questo meccanismo di regolazione permette di mantenere livelli ormonali di CRH e ACTH sufficienti per consentire all'organismo di rispondere adeguatamente ad uno stress successivo. La regolazione di questi circuiti e degli effetti indotti dagli ormoni corticosurrenali a livello centrale dipendono dalla loro interazione con due distinti tipi di recettori: i recettori per i mineralcorticoidi o MR (detti anche recettori di tipo 1) e i recettori per i glucocorticoidi o GR (o recettori di tipo 2) (*Joels e de Kloet, 1994*). Nel cervello, gli MR si trovano principalmente nell'ippocampo, nella struttura limbica, nel setto, nell'amigdala e mediano il controllo dell'attività basale dell'asse. I GR sono presenti in tutto il cervello, con maggiore densità nel sistema limbico

(ippocampo e setto) e nei neuroni parvocellulari del nucleo paraventricolare ipotalamico. Essi, inoltre, sono presenti nei neuroni monoaminergici ascendenti del tronco cerebrale. (Reul e de Kloet, 1985, 1986; Reul et al., 1987; Kiss et al., 1988) (Figura 6).



**Figura 6.** Rappresentazione schematica delle strutture coinvolte nella regolazione a feedback negativo dell'asse IIS.

I GR si attivano con elevati livelli plasmatici di corticosteroidi, raggiunti dopo un evento stressante o durante il picco di impulsi ultradiani (Jacobson et al., 1991; Reul et al., 2000); la loro funzione è quella di sostenere gli stress e superarli (de Kloet e Reul., 1987). Gli MR posseggono un'affinità per i corticosteroidi molto elevata; infatti, essi vengono saturati in condizioni basali ed è stato postulato che possano essere coinvolti nella definizione della

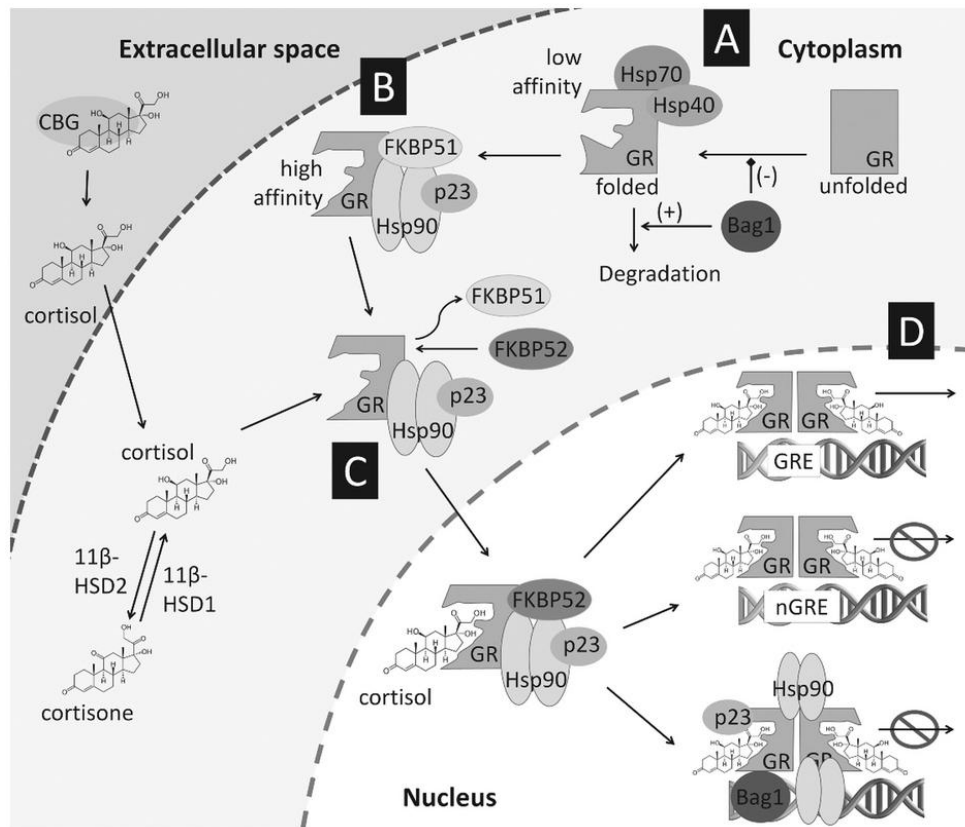
soglia di reattività agli stress (*Reul e de Kloet, 1985; Joëls et al., 2008*). Questo ruolo degli MR è svolto attraverso proiezioni toniche inibitorie, mediate da neuroni GABAergici, che arrivano al nucleo paraventricolare dell'ipotalamo e modulano il rilascio di CRH (*Herman et al., 1996; Swanson, 1991*).

L'equilibrio tra le azioni mediate da MR e GR è indispensabile per determinare la risposta agli stress di un individuo. Alterazioni di questo equilibrio possono determinare una disregolazione del sistema di risposta allo stress e aumentare la vulnerabilità ai disturbi ad esso legati (*de Kloet et al., 2005; McEwen, 2008*).

Entrambi i recettori sono fattori di trascrizione attivati da ligando. Sono localizzati prevalentemente nel citoplasma in forma inattiva finché non si legano ai glucocorticoidi. Sono infatti legati a complessi di proteine inibitorie dello shock termico che in seguito a particolari stimoli traslocano nel nucleo e attivano specifiche sequenze geniche per la trascrizione di proteine.

Il GR nella forma inattiva è legato a due chaperonine dello shock termico (Hsp 40 e 70) e ad una proteina che regola l'attività delle prime due (Bag1). In seguito a stimoli provenienti dai centri nervosi superiori, il recettore dimerizza e passa dalla forma a bassa affinità a quella ad alta affinità, attraverso la sostituzione delle Hsp 40 e 70 con un'altra proteina della stessa famiglia (Hsp90), il legame di un co-fattore (p23), che stabilizza il complesso, e di una proteina appartenente alla famiglia delle immunofiline, la PPIasi FKBP51. A seguito del legame del corticosterone con il GR, si verifica un cambiamento conformazionale che porta al distacco della FKBP51 che viene sostituita con un'altra immunofilina, la FKBP52. A questo punto, il complesso citoplasmatico può migrare nel nucleo, dove va a legarsi a delle specifiche sequenze in grado di riconoscere tali complessi. Le sequenze di riconoscimento per i glucocorticoidi prendono il nome di elementi di risposta ai glucocorticoidi (GRE, Glucocorticoids Responsive Elements o nGRE, negative

Glucocorticoids Responsive Elements). Una volta che il recettore si lega a tali sequenze, può essere avviata o inibita la trascrizione di proteine regolatrici (Sinclair *et al.*, 2013) (Figura 7).



**Figura 7.** (A) Hsp40 e Hsp70 facilitano, mentre Bag1 ostacola, il ripiegamento del recettore, per passare dalla forma a bassa affinità a quella attiva. Bag1 inoltre facilita la degradazione della forma instabile del GR. (B) Hsp90, p23 e FKBP51 stabilizzano il complesso recettoriale nella forma ad alta affinità. (C) Il legame col corticosterone fa sì che FKBP51 si scambi con FKBP52: a questo punto l'eterocomplesso può traslocare nel nucleo. (D) All'interno del nucleo, il recettore attivo o reprime la trascrizione di determinati geni target attraverso le sequenze GRE o nGRE (rispettivamente). L'over-espressione di Bag1, Hsp90 o p23 possono reprimere la trascrizione GR-mediata. Anche la quantità di corticosterone che si può legare al complesso recettoriale GR può influire sulla trascrizione genica. Abbreviazioni: GRE (glucocorticoid responsive elements); nGRE (negative glucocorticoid responsive elements); CBG (Corticosteroid binding globulin); 11β-HSD (11β idrossisteroide deidrogenasi) (Sinclair *et al.*, 2013).

È stato dimostrato che un'alterazione nella funzione delle proteine coinvolte nella regolazione dell'attivazione dei GR (Hsp, Bag1 o FKBP5) o la presenza di polimorfismi per i geni che le codificano, siano associate a disturbi dell'umore, in modo particolare al disturbo post-traumatico da stress, ma anche al disturbo d'ansia generalizzata e a

depressione maggiore nell'uomo (*Binder et al., 2009; O'Leary 3rd et al., 2013*). L'importanza di queste proteine è stata dimostrata anche con la sperimentazione animale: topi knock-out per la proteina FKBP51 infatti, mostrano una disregolazione dell'asse IIS, conseguente all'ipersensibilità dei GR e alla riduzione dei livelli di corticosterone (*Touma et al., 2011*).

L'insorgenza degli effetti genomici mediati dai GR è lenta; le prime risposte fisiologiche infatti dovrebbero essere visibili con un ritardo di almeno 15 minuti, o spesso nell'ordine di ore (*Haller et al., 2008*). Ciò è in netto contrasto con la realtà di alcuni degli effetti dei corticosteroidi nei neuroni, di cui, i più veloci, sono stati osservati in pochi secondi o minuti (*Groeneweg et al., 2011*). È stata dimostrata la presenza di una popolazione di MR e GR localizzati sulla membrana plasmatica (*Karst et al., 2005; Liu et al., 2008*). Tali recettori sembrerebbero essere soggetti ad un trafficking tra citoplasma e membrana indotto da particolari situazioni fisiologiche o stressanti (*Linthorst et al., 2000; Karst et al., 2005*). La dinamica di questo trasporto citoplasma-membrana non è stata ancora chiarita: recenti studi suggeriscono che quello dei GR potrebbe essere un meccanismo molto simile a quello per i recettori agli estrogeni (*Dominguez e Micevych, 2010*). Questi recettori, localizzati a livello di membrana, mediano una risposta rapida del feedback inibitorio dell'asse IIS. Infatti, l'inibizione a feedback negativo esercitata sull'asse IIS presenta due modalità di azione: feedback rapido e feedback lento. Una prima modalità rapidissima, in cui si ha la riduzione della secrezione di ACTH in seguito all'aumento di glucocorticoidi nel sangue; ciò presuppone che tale effetto non sia mediato da recettori citosolici ma da meccanismi di membrana. La seconda tipologia di inibizione si presenta più tardivamente, addirittura dopo alcune ore dallo stimolo stressante, suggerendo che tale effetto sia mediato da meccanismi genomici più lenti attraverso i recettori citosolici. Quindi, i GR e gli MR di membrana sembrerebbero essere importanti per una risposta rapida del feedback negativo



che il corticosterone indurrebbe soprattutto a livello ippocampale ed ipotalamico (*Tasker e Herman, 2011*). L'attivazione dei GR, localizzati sui neuroni CRH, e dei GR e degli MR a livello ippocampale, evoca un complesso meccanismo di risposte che coinvolge i sistemi glutamatergico, GABAergico ed endocannabinoergico al fine di ripristinare l'omeostasi, inibendo la secrezione del CRH. Attraverso un circuito a feedback negativo rapido il prodotto finale inibisce la prima tappa della via che l'ha generato. Studi recenti, infatti, mettono in luce il ruolo, nel controllo della risposta allo stress, svolto dal sistema endocannabinoide. I principali ligandi endogeni che mediano le azioni di questo sistema sono l'anandamide (N-arachidonoiletanolamide, AEA) (*Devane et al., 1992*) e il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) (*Sugiura et al., 1995*), sostanze lipofile prodotte dall'organismo "on demand", a partire da precursori fosfolipidici di membrana. Il 2-AG viene sintetizzato a partire dagli acidi grassi omega 6, acido arachidonico e glicerolo tramite l'azione di una fosfolipasi C e della diacilglicerolo lipasi (DAGL) (*Hillard, 2000; Sugiura e Waku, 2002*), mentre l'AEA viene sintetizzato a partire dal N-arachidonoil fosfatidiletanolamina (NArPE) tramite idrolisi catalizzata da una fosfolipasi D (*Liu et al., 2006; Okamoto et al., 2004*). Per quanto riguarda la terminazione del segnale invece, il 2-AG viene metabolizzato dalla monoacilglicerolo lipasi (MAG lipasi), mentre l'AEA dall'amide idrolasi degli acidi grassi (FAAH) (*Deutsch et al., 2002*). L'esistenza di diverse vie biosintetiche per l'AEA e il 2-AG suggerisce un'azione indipendente dei due endocannabinoidi (eCBs).

A differenza dei classici neurotrasmettitori, gli eCBs non vengono immagazzinati nella cellula in vescicole sinaptiche, ma rapidamente sintetizzati ad opera di specifici enzimi in seguito a precisi stimoli che, con fenomeni calcio dipendenti, ne promuovono la formazione e la successiva liberazione a livello postsinaptico, modulando l'azione di numerosi sistemi neurotrasmettitoriali, quali il sistema GABAergico e glutamatergico,

legandosi, attraverso un meccanismo retrogrado, a dei specifici recettori posti sul terminale presinaptico.

Questi recettori sono di due tipi: i recettori CB1 e CB2: il tipo 1 è espresso a livello del sistema nervoso centrale, mentre il tipo 2 si trova a principalmente livello periferico, ma è stato identificato anche nel cervello in seguito ad infiammazione (*Benito et al., 2008*). Entrambi i recettori per gli eCBs appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G. La loro attivazione porta all'inibizione dell'enzima adenilato ciclasi; inoltre i recettori CB1 sono in grado di attivare i canali al potassio e inibire i canali al calcio di tipo N e P/Q (è questo probabilmente il meccanismo attraverso il quale riescono ad inibire il rilascio di neurotrasmettitore).

Grazie alla loro peculiare localizzazione presinaptica, i recettori CB1 risultano importanti a livello della terminazione poiché controllano il rilascio delle vescicole contenenti neurotrasmettitori come glutammato, GABA e dopamina (*Schlicker e Kathmann, 2001*). Infatti, sono stati trovati nelle strutture cerebrali coinvolte nella risposta allo stress come ippocampo, amigdala e corteccia prefrontale. In queste aree si trovano particolarmente espressi negli interneuroni GABAergici (*Marsicano e Kuner, 2008*) e, in misura minore, nei terminali glutamatergici (*Monory et al., 2006; Kawamura et al., 2006; Kano et al., 2009*). Inoltre, evidenze dimostrano una loro presenza a livello del nucleo paraventricolare dell'ipotalamo. In quest'area, grazie a tecniche di immunoistochimica, sono stati localizzati prevalentemente nei terminali GABAergici (*Castelli et al., 2007*), e recentemente anche a livello dei neuroni glutamatergici (*Hrabovszky et al., 2012*).

L'AEA si lega sia al recettore CB1 sia, seppur con affinità minore, al recettore CB2 (*Felder et al., 1995*) comportandosi da agonista parziale (*Burkey et al., 1997; Glass et al., 1999*). Numerose evidenze sperimentali dimostrano che l'AEA è presente ad elevate concentrazioni nell'ippocampo (*Felder et al., 1996; Koga et al., 1997; Bisogno et al.,*

1999), nella corteccia, nel talamo (*Felder et al., 1996*), nel cervelletto, nel sistema limbico, nello striato, nel diencefalo e nel mesencefalo (*Bisogno et al., 1999*) di differenti specie animali, incluso l'uomo (*Felder et al., 1996*). Inoltre, i livelli di AEA sono direttamente correlati alla distribuzione del recettore CB1 a livello del sistema nervoso centrale. A differenza dell'AEA, il 2-AG lega entrambi i recettori per gli eCBs, agendo su entrambi come agonista completo. Il 2-AG presenta la stessa localizzazione dell'AEA sia a livello periferico che centrale, ma a livello del sistema nervoso centrale è presente a concentrazioni circa 200 volte maggiori di quelle dell'AEA (*Sugiura et al., 1995; Mechoulam et al., 1995; Stella et al., 1997*). Inoltre, i due eCBs mediano effetti diversi a livello del sistema nervoso centrale: il 2-AG media la soppressione a breve termine del rilascio di neurotrasmettitori (è quindi coinvolto nell'attivazione del feedback rapido) (*Kano et al., 2009*), mentre l'AEA è coinvolto nell'attivazione tonica dei recettori CB1 (*Kim e Alger, 2010*). Sempre più risultati, inoltre, indicano il 2-AG come il principale ligando endogeno dei recettori per gli endocannabinoidi (*Sugiura et al., 2002*).

Numerose evidenze mostrano quindi come stress, emozioni e sistema endocannabinoide siano fortemente interconnessi tra di loro. Dati recenti suggeriscono un effetto addizionale sul meccanismo a feedback dell'asse IIS. Infatti, l'applicazione di corticosterone induce rapidamente la sintesi di endocannabinoidi in fettine di ipotalamo (*Malcher-Lopes et al., 2006*); questo effetto è stato riscontrato anche in vivo, sia nell'ipotalamo (*Evanson et al., 2010; Hill et al., 2010*) che nella corteccia prefrontale mediale (*Hill et al., 2011*). Un simile effetto del corticosterone, nello stimolare il rilascio di eCBs, è stato osservato anche nell'amigdala basolaterale (*Campolongo et al., 2009; Hill e McEwen, 2009*). Inoltre, è stato visto che il corticosterone sopprime il rilascio di glutammato dalle sinapsi eccitatorie in fettine di ipotalamo (*Di et al., 2003*). Gli studi sul sistema endocannabinoide sono ad oggi ancora in corso: numerosi studi si concentrano sui cambiamenti dei livelli degli eCBs

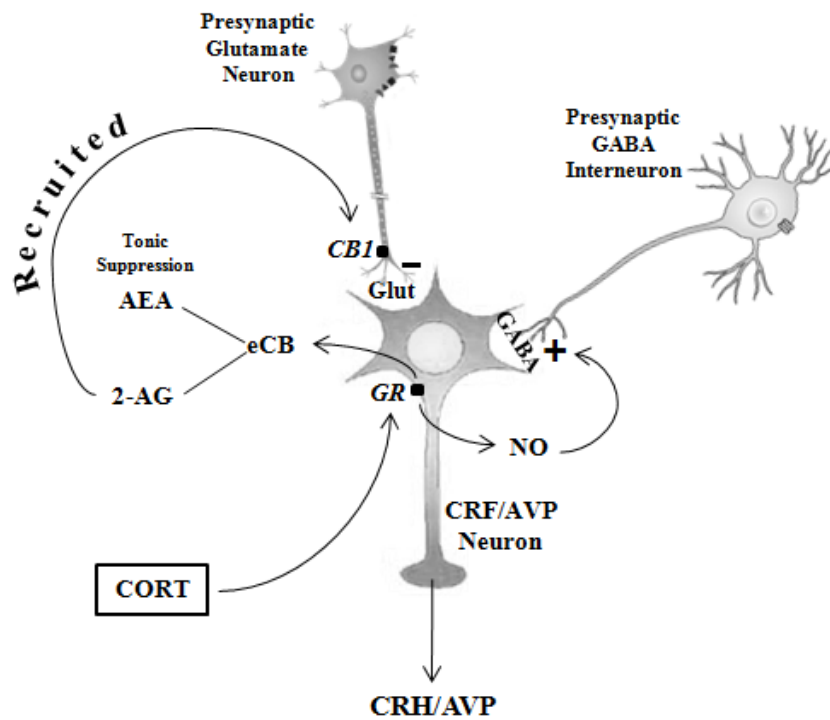
in seguito a stress acuto o cronico, ma i risultati sono ancora oggetto di discussione perché differenti tra loro (Tabella 1).

Species	Stressor	Brain region	Effect	References
Male Lister hooded rats	Food restriction for 24 h	Limbic forebrain	Increased 2-AG and AEA	Kirkham et al. (2012)
Male C57BL/6J mice	Tone (24 h after tone-shock conditioning)	Amygdala	Increased 2-AG and AEA	Marsicano et al. (2002)
Male ICR mice	30 min restraint	Amygdala	Decreased 2-AG	Patel et al. (2005a,b)
Sprague-Dawley rats	30 min restraint	PFC, hippocampus	Increased 2-AGdecreased AEA	Hill et al. (2007)
Male ICR mice	Restraint 30 min/day, 1, 7, 10 days	Amygdala	Decreased AEA	Rademacher et al. (2008)
	Restraint 30 min/day, 10 days	Amygdala	Increased 2-AG	
	Restraint 30 min/day, 7, 10 days	PFC	Decreased AEA	
Male, Long-Evans rats	Chronic, unpredictable stress for 21 days	PFC, hippocampus, amygdala	Decreased AEA	Hill et al. (2008)
Male Sprague-Dawley rats	30 min restraint	Amygdala	Decreased AEA	Hill et al. (2009)
Male Sprague-Dawley rats	Social isolation for 7 weeks	PFC	Increased 2-AG	Sciolino et al. (2010)
Sprague-Dawley rats	30 min restraint for 9 consecutive days	PFC, hippocampus, amygdala	Decreased AEA	Hill et al. (2010)
Male Sprague-Dawley rats	30 min restraint	PFC	Increased 2-AG	Hill et al. (2011)
Male Lister-hooded rats	Fear-conditioned rats (10 footshocks (0.4 mA, 1-s duration))	Ventral hippocampus	Increased 2-AG and AEA	Ford et al. (2011)
Male Sprague-Dawley rats	Footshock (0.45 mA)	Amygdala, hippocampus medial PFC	Increased AEA	Morena et al. (2012)

**Tabella 1.** Effetto dell'esposizione a differenti tipi di stress sui livelli degli eCBs in diverse aree cerebrali (Akirav, 2013).

Oltre i livelli di 2-AG ed AEA, sulla risposta allo stress possono influire anche l'espressione e la funzionalità dei loro recettori. Infatti, bloccando, geneticamente o farmacologicamente, i recettori CB1 nel nucleo paraventricolare dell'ipotalamo, si osserva una risposta neuroendocrina esagerata allo stress (Evanson *et al.*, 2015). Questo può essere dovuto al blocco dell'inibizione rapida dell'asse IIS conseguente all'interruzione del segnale mediato dagli eCBs, che risulta quindi in un'iperattivazione dell'asse IIS.

Di conseguenza, il sistema endocannabinoide, sembra coinvolto nel feedback rapido dell'asse IIS. L'attivazione dei GR nel nucleo paraventricolare, indotta dal corticosterone, promuove la sintesi di endocannabinoidi, che attivano i recettori CB1 presenti sui terminali presinaptici glutamatergici, sopprimendo il rilascio di glutammato e riducendo quindi l'attivazione dei neuroni che secernono CRH, del nucleo paraventricolare (Hill *et al.*, 2010b), con la conseguente attenuazione della risposta allo stress (Figura 8).



**Figura 8.** Meccanismi cellulari della modulazione a feedback nell'ipotalamo (ingrandimento della Figura 6). Il corticosterone, agendo sui GR presenti a livello del neurone ipotalamico secernente CRH, stimola la produzione di endocannabinoidi che, agendo in maniera retrograda sul neurone presinaptico glutammatergico, inibiscono il rilascio di glutammato e di conseguenza il rilascio di CRH. Inoltre, il corticosterone, sempre tramite l'azione dei GR, favorisce il rilascio di nitrossido (NO), che agendo come messaggero retrogrado, stimola il rilascio di GABA dall'interneurone GABAergico, il quale inibisce il neurone ipotalamico secernente CRH.

## 1.5 L'isolamento sociale

Come detto precedentemente, l'infanzia e l'adolescenza sono due periodi critici per lo sviluppo del sistema nervoso centrale. Durante questi periodi infatti, la plasticità sinaptica nei mammiferi risulta particolarmente attiva (*Greenough et al., 1987; O'Leary et al., 1995*) ed è stato dimostrato che eventi o situazioni stressanti vissuti durante le prime fasi di vita dell'animale influiscono negativamente sullo sviluppo cerebrale e comportamentale, rendendolo così più suscettibile allo sviluppo di disordini neurologici in età adulta (*Anisman et al., 1998; Weiss e Feldon, 2001*). Gli stessi effetti si sono visti nell'uomo, in cui le esperienze negative vissute durante l'infanzia e l'adolescenza possono aumentare il rischio di insorgenza e sviluppo di patologie psichiatriche, quali schizofrenia, ansia e depressione, in età adulta (*Lewis e Miller, 1990; Weinberg, 1987; Heim e Nemeroff 2001*).

Sono numerosi i modelli sperimentali, in animali da laboratorio, atti a mimare alcuni degli aspetti più significativi tipici delle patologie neurobiologiche che affliggono l'uomo. L'isolamento sociale, ad esempio, viene considerato un modello sperimentale di ansia e depressione e viene usato per studiare questi disturbi psichiatrici. È un modello di stress cronico che prevede l'allontanamento dell'animale dai propri simili, privandolo dell'interazione sociale con i conspecifici. Questa procedura risulta particolarmente efficace nell'indurre uno stato di stress cronico in ratti e topi, data la natura gregaria di queste specie. Il modello dell'isolamento sociale è stato validato negli anni '50 e '60 del secolo scorso, quando alcuni ricercatori descrissero il comportamento dei ratti e dei topi da esperimento allevati individualmente per lunghi periodi di tempo, senza il contatto fisico con gli animali della stessa specie. Esso consiste nella stabulazione dei ratti in gabbie singole per 30 giorni a partire dal giorno dello svezzamento, che negli animali rappresenta l'inizio dell'adolescenza. Poiché, come già detto, si tratta di uno stress indotto durante una

fase critica dello sviluppo, caratterizzata dal gioco e dal contatto con i propri simili (*Einson e Morgan, 1977*), questo produce una serie di alterazioni comportamentali e fisiologiche che influenzano il comportamento dell'animale da adulto.

Gli animali cresciuti in queste condizioni presentano delle caratteristiche peculiari: si mostrano reattivi alla manipolazione (*Wiberg et al., 1963; Ader e Friedman, 1964*), timidi (*Moyer e Korn, 1968*), emotivi (*Koch ed Arnold, 1972*) e aggressivi (*Yen et al., 1958*). Uno degli aspetti comportamentali che caratterizzano gli animali socialmente isolati è la spiccata aggressività verso lo sperimentatore che ne rende difficile la manipolazione, indicando uno stato emozionale alterato. L'aggressività si manifesta anche nei confronti dei conspecifici quando, dopo il periodo di isolamento, gli animali vengono rimessi in gruppo (*Kostowski et al., 1977; Wongwitdecha e Mardsen, 1996; Karim e Arslan, 2000*). Numerosi test sono stati utilizzati in questi animali per determinarne lo stato emozionale ed è stato dimostrato che l'isolamento sociale induce nell'animale uno stato conflittuale. Infatti, nel test dell'elevated plus maze, gli animali isolati trascorrono più tempo nei bracci chiusi (*Karim e Arslan, 2000; Serra et al., 2000*) e nel test di Vogel il numero delle bevute con punizione è ridotto, rispetto agli animali stabulati in gruppo (*Serra et al., 2000*). In accordo con questa aumentata emotività, numerosi studi hanno mostrato che l'isolamento sociale determina un aumento dell'attività locomotoria in un nuovo ambiente (*Sahakian et al., 1977; Silva-Gomez et al., 2003; Hellemans et al., 2004*). Inoltre, gli animali isolati impiegano più tempo per entrare in un nuovo spazio a loro non familiare (neofobia) (*Einson e Morgan, 1977; Dalrymple-Alford e Benton, 1984*) e mostrano un aumento della defecazione (indice di uno stato ansioso) se posti in un campo aperto (open field) (*Holson et al., 1991; Hall et al., 1997*).

Il comportamento ansioso e conflittuale degli animali isolati è associato all'alterazione dell'attività del recettore GABA<sub>A</sub> (*Harro et al., 1990; Robertson et al., 1978; Serra et al.,*

2000). Un possibile meccanismo attraverso il quale lo stress cronico, determinato dall'isolamento sociale, induce una “*down regulation*” della trasmissione GABAergica potrebbe essere dovuta ad una modificazione della conformazione del recettore GABA<sub>A</sub> in seguito ad una variazione nell'espressione di diverse subunità che compongono il recettore GABA<sub>A</sub> (Serra *et al.*, 2006).

Inoltre, l'isolamento sociale nel ratto induce una riduzione dei livelli cerebrali e plasmatici di AP e THDOC (Matsumoto *et al.*, 1999; Serra *et al.*, 2000). Il meccanismo molecolare responsabile di questa riduzione non è ancora del tutto chiarito. E' stato ipotizzato (Matsumoto *et al.*, 1999) che l'isolamento sociale riduca l'attività o l'espressione dell'enzima 3 $\alpha$ -HSD che catalizza la riduzione del DHP in AP: la diminuzione dell'attività di questo enzima porterebbe ad una riduzione dei livelli cerebrali di AP. Questa ipotesi è sostenuta dal fatto che, in alcuni ceppi di topo, l'effetto dell'isolamento sociale è selettivo per questo steroide (Matsumoto *et al.*, 1999). Tuttavia è plausibile che l'effetto di tale condizione sia mediato da altri meccanismi.

Gli animali isolati sono, inoltre, più sensibili all'effetto steroidogenico indotto dallo stress acuto. Questo meccanismo di risposta è mediato dall'asse IIS, come dimostrato dall'evidenza che in ratti castrati e surrenectomizzati lo stress acuto o la somministrazione di farmaci che riducono la trasmissione GABAergica non modifica le concentrazioni cerebrali di AP e THDOC (Barbaccia *et al.*, 1997). Gli animali socialmente isolati, quando sottoposti ad uno stress acuto come il foot-shock, mostrano un aumento dei livelli di CTS, AP e THDOC molto maggiore rispetto agli animali stabulati in gruppo (Serra *et al.*, 2000). Questa evidenza è in accordo con l'idea che, durante lo stress cronico, si sviluppi una “traccia facilitatoria”, caratterizzata da una maggiore sensibilità dell'asse IIS ai nuovi stimoli stressanti (Akana *et al.*, 1992).



L'evidenza che gli animali isolati mostrano una risposta esagerata allo stress rispetto a quelli stabulati in gruppo, unita a quella della riduzione della steroidogenesi basale, suggerisce che la funzione dell'asse IIS di questi animali sia alterata. Questa ipotesi è stata confermata mediante il test di soppressione del desametasone (DEX) (uno steroide di sintesi 40 volte più potente del cortisolo o del corticosterone), test che permette di verificare l'eventuale presenza di alterazioni dell'asse IIS e di verificare se esistono delle differenze nella capacità del DEX di sopprimere la secrezione basale di corticosterone attraverso la sua interazione con i recettori per i glucocorticoidi presenti nell'ipofisi e nel cervello. Ciò è possibile utilizzando due differenti dosi (*Miller et al., 1992*): a basse dosi infatti (3 µg/kg i.p.) il DEX è in grado di determinare un effetto prevalentemente attraverso un'azione a livello ipofisario (*Mizoguchi et al., 2001*), data la sua scarsa capacità di penetrare la barriera ematoencefalica (*de Kloet et al., 1975; Miller et al., 1992; Meijer et al., 1998*). A dosi più elevate (500 µg/kg i.p.) il DEX penetra anche nel cervello (*Miller et al., 1992*), legandosi ai recettori ippocampali e ipotalamici. Negli animali stabulati in gruppo entrambe le dosi di DEX hanno dimostrato di ridurre significativamente la concentrazione plasmatica di corticosterone in modo dose-dipendente. Al contrario, negli animali socialmente isolati, la dose più bassa di DEX non è stata in grado di ridurre significativamente i livelli plasmatici di corticosterone, mentre la dose più alta riduce sensibilmente tali livelli, ma in maniera meno marcata rispetto a quella osservata negli animali di controllo (*Serra et al., 2005*).

Sebbene i livelli plasmatici basali di ACTH siano ridotti dopo 30 giorni di isolamento sociale, la somministrazione intracerebroventricolare di CRH (500ng/5µl), utilizzata per mimare uno stress acuto, induce un aumento dei livelli plasmatici di corticosterone che risulta molto più marcato negli animali socialmente isolati, sottolineando ancora una volta l'ipersensibilità dell'asse di questi animali (*Serra et al., 2005*).

Questi dati hanno suggerito che l'isolamento sociale nel ratto riduce il feedback negativo, sia nell'ipofisi che nelle stazioni centrali superiori (ipotalamo e ippocampo) importanti nel controllo di tale funzione. I meccanismi alla base di questa disregolazione sono molteplici ma non sono stati ancora del tutto chiariti, per via della complessità del circuito, regolato da diversi sistemi che interagiscono tra loro.

## 1.6 Obiettivo della tesi

Nei nostri laboratori è stato precedentemente dimostrato come l'isolamento sociale durante l'adolescenza modifichi la steroidogenesi basale e le risposte neuroendocrine allo stress nei ratti maschi adulti (*Serra et al.*, 2000; 2005; 2006). Queste evidenze ci hanno portato ad ipotizzare che alla base di queste alterazioni ci potesse essere una modificazione nella coordinazione delle risposte dell'asse IIS.

Sulla base di queste premesse, l'attività di ricerca svolta durante il mio dottorato di ricerca si è focalizzata sullo studio dei meccanismi coinvolti nella regolazione a feedback negativo dell'asse IIS in seguito all'esposizione ad uno stress acuto negli animali sottoposti a isolamento sociale durante l'adolescenza.

A tale scopo ho voluto valutare:

1. le variazioni dei livelli di corticosterone durante il periodo di isolamento sociale;
2. l'effetto dell'isolamento sociale sulla risposta ad uno stress acuto nel tempo attraverso:
  - i livelli plasmatici di corticosterone;
  - i livelli ipotalamici di CRH;
  - l'espressione nell'ippocampo e nell'ipotalamo dei GR;
  - l'espressione nell'ipotalamo dei recettori CB1 per gli endocannabinoidi;
  - i livelli plasmatici di allopregnanolone;
3. l'effetto della deprivazione sociale sulla capacità dell'asse IIS di rispondere a due stimoli stressanti consecutivi;
4. l'effetto del trattamento farmacologico con un antagonista dei recettori ai glucocorticoidi (mifepristone) sui livelli plasmatici di corticosterone;
5. l'effetto dell'isolamento sociale sull'espressione ipotalamica delle subunità  $\alpha_4$  e  $\delta$  del recettore GABA<sub>A</sub>;

6. l'effetto dell'isolamento sociale e la sensibilità allo stress acuto sui livelli ipotalamici del 2-AG.

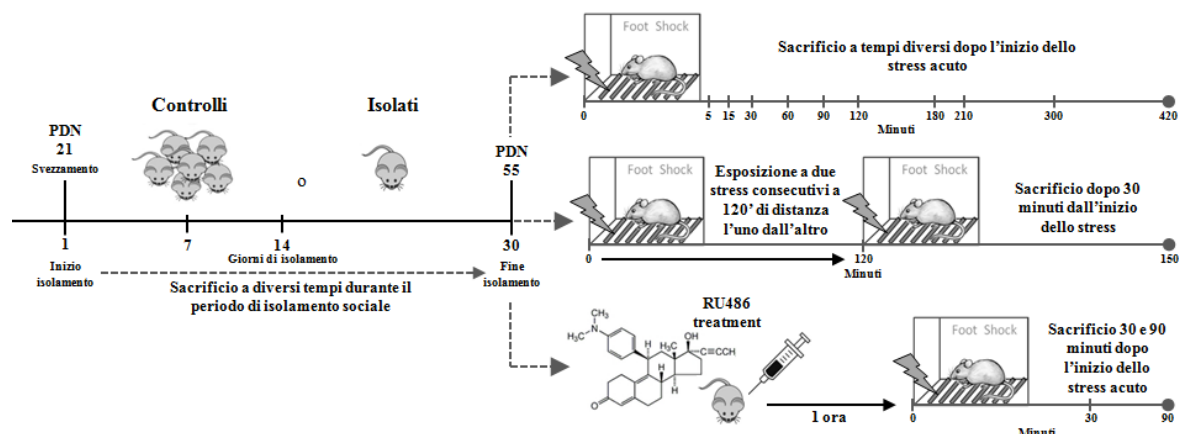
## Capitolo 2.

### Materiali e metodi

#### 2.1 Animali

Per i miei esperimenti ho utilizzato ratti maschi Sprague-Dawley, del ceppo CD (Charles River, Como, Italia). Gli animali a circa 21-25 giorni di età, immediatamente dopo lo svezzamento, sono stati assegnati in maniera casuale al gruppo di controllo o a quello socialmente isolato. Sono stati quindi stabulati per 30 giorni in gruppi di 5-6 per gabbia (59x38x20cm) o individualmente in gabbie più piccole (42x26x15cm). Gli animali sono stati mantenuti con un ciclo artificiale giorno/notte di dodici ore (luce dalle 8:00 alle 20:00) ad una temperatura costante di  $23 \pm 2$  °C e con un'umidità del 65% e hanno avuto libero accesso al cibo e all'acqua. Tutte le procedure sperimentali sono state condotte tra le 08:00 e le 13:00 (Figura 9).

La stabulazione degli animali e la loro manipolazione durante le procedure sperimentali sono avvenute nel rispetto della direttiva emanata dal Parlamento Europeo il 22 settembre 2010 (2010/63/UE).



**Figura 9.** Rappresentazione schematica della procedura sperimentale utilizzata in questa tesi.

## 2.2 Isolamento sociale

Il protocollo di isolamento sociale prevede la stabulazione dell'animale in gabbie singole, dal giorno dello svezzamento dalla madre (21-25 giorni di età) per un periodo di tempo di 4 settimane. Il giorno dello svezzamento gli animali sono stati suddivisi in due gruppi sperimentali:

- Controlli, stabulati in gruppo in gabbie da 5-6 animali ciascuna;
- Isolati, stabulati in gabbie singole (socialmente isolati) per 30 giorni.

I ratti sono stati assegnati ai due gruppi sperimentali in maniera random. Durante l'isolamento sociale gli animali sono stati manipolati una volta a settimana (per il cambio lettiera). Gli animali (controlli e isolati) sono stati stabulati nella stessa stanza, mantenendo per tutti le stesse condizioni di allevamento.

## 2.3 Foot-shock stress

L'apparecchio del foot-shock è costituito da:

- una gabbia in plexiglas delle dimensioni di 28x22 x27 cm con due lati opachi;
- uno stimolatore collegato al pavimento della gabbia.

Il pavimento della gabbia è costituito da una serie di sbarre in ottone collegate allo stimolatore in maniera tale che la polarità elettrica delle due sbarre successive sia inversa. Ogni secondo lo stimolatore rilascia una scarica elettrica pari a 0,2 mA della durata di 500 msec. Gli animali sono stati sottoposti al foot-shock stress per una durata totale di 5 minuti e poi sacrificati a diversi tempi dopo lo stimolo elettrico per la valutazione della sensibilità allo stress acuto.

## 2.4 Western blot

Gli animali sono stati sacrificati tramite decapitazione con la ghigliottina e il loro cervello è stato immediatamente estratto dal cranio, sezionato per suddividerlo nelle diverse aree cerebrali di mio interesse (ippocampo e ipotalamo) e conservato a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento del processamento.

La tecnica del Western blot (Towbin et al., 1979) è stata utilizzata per valutare l'espressione dei recettori per i glucocorticoidi (GR), dei recettori per gli endocannabinoidi (CB1), delle subunità  $\alpha_4$  e  $\delta$  del recettore GABA<sub>A</sub> e per valutare le concentrazioni dell'ormone di rilascio della corticotropina (CRH).

La metodica consiste in una separazione, in base al peso molecolare, del contenuto totale proteico del campione attraverso una corsa elettroforetica, un trasferimento da un gel di acrilamide ad un supporto solido e una marcatura con sonde specifiche. Il marcatore utilizzato è un anticorpo specifico diretto contro un dominio della proteina.

La tecnica del Western blot può essere divisa in sei principali fasi:

- preparazione dell'estratto proteico;
- separazione delle diverse proteine attraverso l'elettroforesi su gel di poliacrilammide;
- trasferimento delle proteine su una membrana di nylon, nitrocellulosa o PVDF (polivinildienedifluoruro);
- blocco di siti non specifici nella membrana;
- aggiunta degli anticorpi e reazione antigene-anticorpo;
- visualizzazione del complesso antigene-anticorpo.

Per l'estrazione dei campioni ho utilizzato un kit di estrazione (Bio Basic Inc.) che permette la separazione delle proteine citoplasmatiche, nucleari e di membrana.

La concentrazione proteica dei campioni da caricare sul gel è stata determinata attraverso l'utilizzo di un kit (BioRad DC ProteinAssay) che si basa sui principi del metodo di Lowry attraverso la costruzione di una curva di regressione ottenuta mettendo in relazione le quantità note di albumina (BSA) e la loro densità ottica. Ho utilizzato la frazione contenente le proteine di membrana di ipotalamo e ippocampo per la quantificazione dei GR, dei recettori CB1 e delle subunità  $\alpha_4$  e  $\delta$  del recettore GABA<sub>A</sub>, mentre per la misurazione del CRH ho utilizzato la frazione citoplasmatica dell'ipotalamo.

Una volta ottenuto l'estratto proteico, i campioni (40 $\mu$ g/15 $\mu$ l) sono stati denaturati in un bagnetto a secco (70°C) per 10 min e posti in ghiaccio; infine caricati nel gel di poliacrilamide (Bis-Tris Midi-gel 4-12%, Life Technologies) dove le proteine sono state separate (200V per 40-60 minuti). In seguito alla corsa, le proteine sono state trasferite su un supporto solido (membrana di PVDF) sotto l'azione di un campo elettrico (elettroblotting) a 75V per 90 minuti.

Al termine del trasferimento la membrana è stata lavata in tampone (TBS-T, pH 7,6) e successivamente incubata con il blocking (latte magro in polvere, 5% p/v) per il blocco dei siti non specifici nella membrana, per impedire che l'anticorpo successivamente utilizzato si leghi su di essi in maniera non specifica.

Al termine del blocking la proteina d'interesse è stata rilevata nella membrana attraverso la marcatura con l'anticorpo primario (incubazione overnight, 4°C). Per i miei esperimenti ho utilizzato un anticorpo primario specifico per il recettore GR (Santa Cruz, diluizione 1:200), per il peptide CRH (Santa Cruz, diluizione 1:200), per recettore il CB1 (Calbiochem, diluizione 1:500), per la subunità  $\alpha_4$  (Santa Cruz, diluizione 1:100) e per la subunità  $\delta$  (PhosphoSolutions, diluizione 1:500). Come standard interno ho utilizzato un anticorpo per la gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi (GAPDH) (Millipore, diluizione 1:5000).



La membrana è stata successivamente incubata con l'anticorpo secondario specifico per ogni anticorpo primario (anti-rabbit per GR, CB1,  $\alpha_4$ ,  $\delta$  e CRH, anti-mouse per GAPDH) legato al marcatore HRP (horseradish peroxidase) per 1 ora a temperatura ambiente e sviluppata attraverso l'utilizzo di un kit (Millipore Luminata<sup>TM</sup> Forte Western HRP Substrate). Al termine dello sviluppo, la quantità delle proteine espresse è stata determinata misurando la densità ottica della bande attraverso l'utilizzo del Geliance 600 (Perkin Elmer). Le immagini acquisite sono state digitalizzate ed analizzate per mezzo di uno specifico software (GeneSnap e Gene Tools, Perkin Elmer).

I dati sono stati normalizzati dividendo la densità ottica di ciascuna banda specifica relative per le proteine GR, CB1 e CRH con quelle corrispondenti dello standard interno GAPDH.

## **2.5 Trattamento con mifepristone (RU486)**

Il mifepristone (RU486) è uno steroide di sintesi, antagonista non-selettivo dei GR, ai quali si lega con un'affinità maggiore del desametasone, impedendo il legame del corticosterone a questi recettori.

Un gruppo di animali di controllo (stabulati in gruppo) è stato utilizzato per il trattamento con RU486. A 60 giorni di età gli animali sono stati trattati attraverso iniezione sottocutanea con RU486 (Sigma Aldrich, Milan, Italy) disciolto in etanolo 5% e glicole propilenico (120mg/2ml/kg di peso corporeo); il gruppo di controllo (veicoli) è stato trattato con una soluzione veicolante contenente solo etanolo e glicole propilenico (2ml/kg di peso corporeo). Un'ora dopo il trattamento entrambi i gruppi (RU486 e veicoli) sono stati sottoposti al foot-shock e sacrificati dopo 30 e 90 minuti dall'inizio dello stress per la misurazione dei livelli di corticosterone. Per la misurazione dei livelli basali di CTS gli

animali sono stati sacrificati 90 minuti dopo la somministrazione del farmaco o della soluzione veicolante.

## **2.6 Misurazione del corticosterone**

Gli animali sono stati sacrificati con la ghigliottina. Il sangue è stato prelevato dal corpo dell'animale, raccolto in provette contenenti un anticoagulante (EDTA) e centrifugato a 900 x g per 10 minuti in modo da separare il plasma che poi è stato congelato a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'utilizzo. Il corticosterone è stato misurato attraverso un kit ELISA (Corticosterone ELISA, IBL International, Germany). La misurazione è stata effettuata secondo le istruzioni del kit usando una piastra da 96 pozzetti in cui è adesivo un anticorpo policlonale che riconosce una porzione della molecola del corticosterone. Assieme ai campioni (in duplicato), sulla piastra è stata caricata una curva standard a 7 punti utilizzata per la quantificazione del corticosterone. Le densità ottiche sono state ottenute attraverso un lettore di piastra (Plate reader, Perkin-Elmer) alla lunghezza d'onda di  $450\pm 10\text{ nm}$ .

## **2.7 Estrazione e misurazione degli endocannabinoidi**

La misurazione degli endocannabinoidi è stata effettuata in collaborazione con il prof. Sebastiano Banni (Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Cagliari).

Gli ipotalami sono stati omogenati con una soluzione di cloroformio-metanolo (2:1, v/v) contenente il 2-AG deuterato. I campioni sono stati centrifugati (900 x g) per ottenere la separazione della fase organica contenente il cloroformio (all'interno della quale si trovano gli endocannabinoidi) da quella acquosa contenente metanolo. Successivamente, la fase

organica è stata prelevata e il cloroformio fatto evaporare tramite vacuum. I campioni sono stati successivamente risospesi in metanolo al 100%.

La quantificazione del 2-AG è stata effettuata tramite cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (HPLC-MS).

## **2.8 Misurazione dell'allopregnanolone**

Gli animali sono stati sacrificati con la ghigliottina. Il sangue è stato prelevato dal corpo dell'animale, raccolto in provette contenenti un anticoagulante (EDTA) e centrifugato a 900 x g per 10 minuti in modo da separare il plasma che poi è stato congelato a -20° C fino al momento dell'estrazione.

Gli steroidi plasmatici sono stati estratti per quattro volte da 1 ml di plasma con 3 ml di acetato di etile. La fase organica è stata portata a secco sotto vuoto e il pellet è stato successivamente risospeso in esano-propanolo (70:30 v/v) prima del dosaggio. Il recupero (80-90%) degli steroidi attraverso le procedure di estrazione è stato controllato tramite l'aggiunta al plasma di quantità traccianti di corticosterone triziato (8000 cpm). L'analisi quantitativa degli steroidi è stata effettuata mediante dosaggio radioimmunologico (RIA) con anticorpi specifici per l'AP (fornito dal dott. R. H. Purdy dell'Università di San Diego, California). I dati sono espressi come ng di steroide per ml di plasma e sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza (ANOVA). La comparazione multipla delle medie è stata effettuata utilizzando il test "post hoc" di Newman-Keuls.

## 2.9 Analisi statistica

I dati sono stati espressi come media  $\pm$  SEM di ciascun gruppo sperimentale e sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza (ANOVA). La significatività statistica delle differenze è stata valutata mediante l'analisi del test Newman-Keuls e un valore di  $p < 0.05$  è stato considerato il limite di accettazione della significatività statistica.

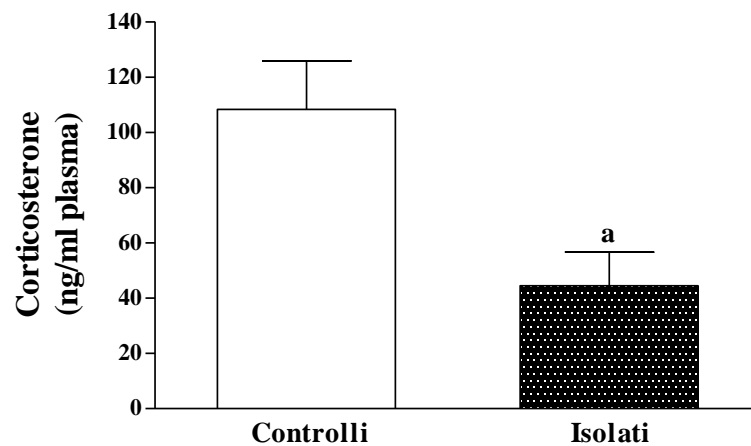
## Capitolo 3.

### Risultati

#### 3.1 Effetto dell'isolamento sociale sui livelli plasmatici basali di corticosterone

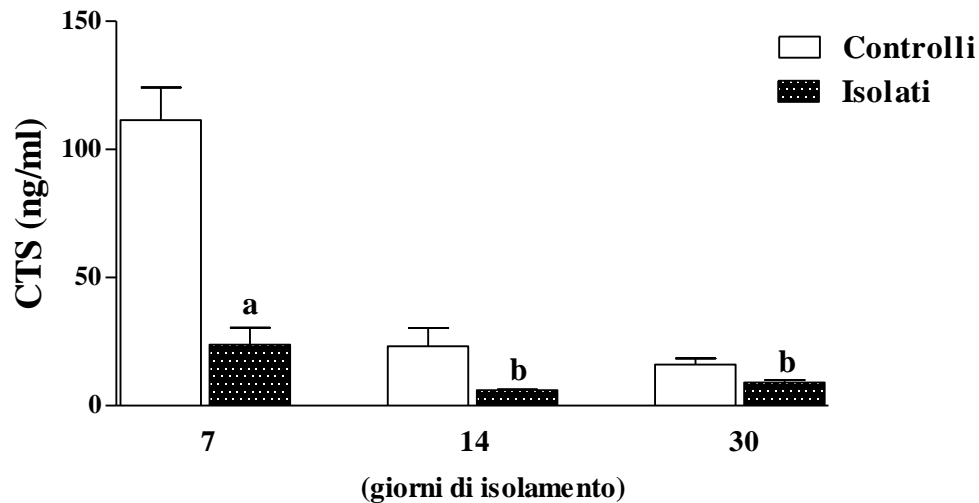
Nei nostri laboratori è stato dimostrato (*Serra et al., 2000*) che l'isolamento sociale per 30 giorni, immediatamente dopo lo svezzamento, induce nei ratti maschi un comportamento ansioso, dimostrato attraverso il test di Vogel e il test dell'elevated plus maze.

Sulla base di questa evidenza, ho misurato la concentrazione plasmatica di corticosterone (CTS), ormone direttamente implicato negli stati d'ansia e nella risposta allo stress. L'isolamento sociale induce una significativa riduzione dei livelli plasmatici basali di corticosterone (-58%,  $p < 0.01$ ; Figura 10).



**Figura 10. Effetto dell'isolamento sociale sui livelli plasmatici di corticosterone.** I ratti sono stati stabulati singolarmente (isolati) o in gruppo (controlli), immediatamente dopo lo svezzamento, per 30 giorni, dopo i quali sono stati sacrificati per la misurazione del corticosterone. I dati, espressi come ng/ml, rappresentano la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls. <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. i ratti di controllo.

Questa riduzione è presente già dalla prima settimana (-78%,  $p<0.01$ ) e persiste durante tutto il periodo dell'isolamento (-74%,  $p<0.05$  nella seconda e -44%,  $p<0.05$  nella quarta settimana; Figura 11).

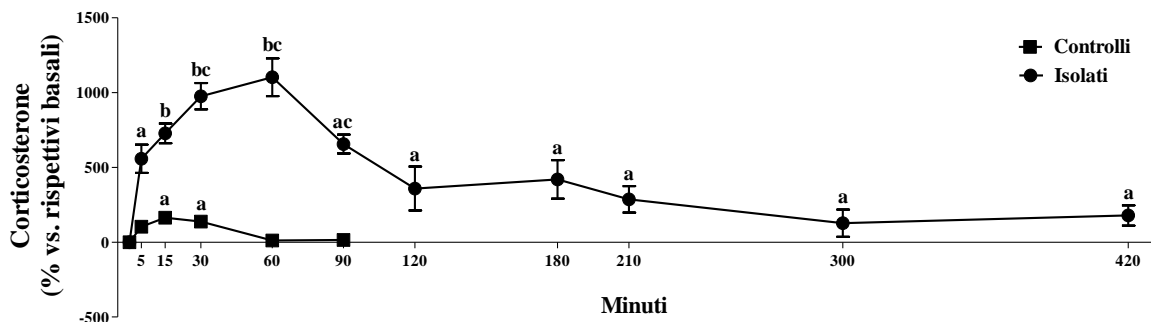


**Figura 11. Effetto dell'isolamento sociale sui livelli plasmatici di corticosterone a tempi diversi durante il periodo di isolamento.** I ratti sono stati stabulati singolarmente (isolati) o in gruppo (controlli), immediatamente dopo lo svezzamento, per 30 giorni, dopo i quali sono stati sacrificati per la misurazione del corticosterone dopo 7, 14 e 30 giorni dall'inizio dell'isolamento. I dati, espressi come ng/ml, rappresentano la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls. <sup>a</sup> $p<0.01$ , <sup>b</sup> $p<0.05$  vs. i ratti di controllo.

### 3.2 Effetto del foot-shock stress sui livelli plasmatici di corticosterone dei ratti socialmente isolati

Come precedentemente dimostrato (Serra *et al.*, 2000; 2005), uno stress acuto come il foot-shock aumenta le concentrazioni plasmatiche di CTS in maniera molto più marcata nei ratti isolati rispetto ai ratti di controllo, sottolineando un'iperresponsività dell'asse IIS nei ratti socialmente isolati.

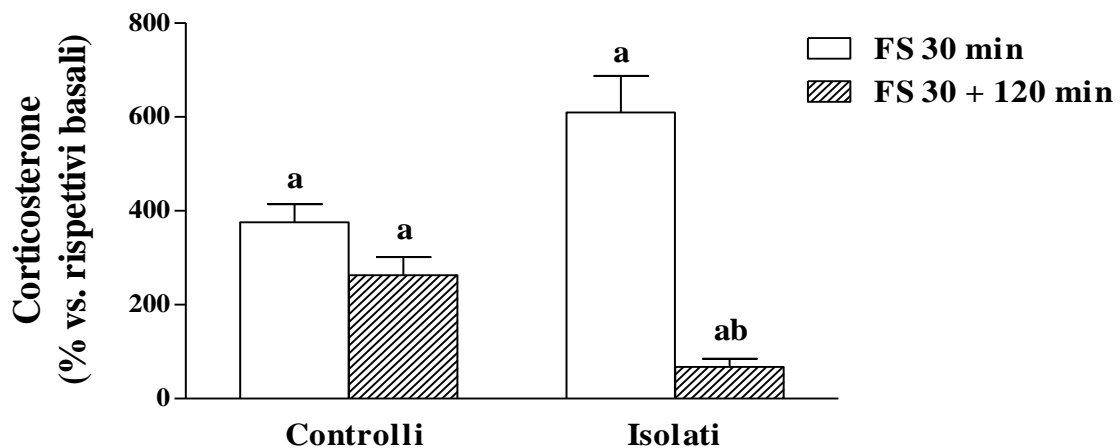
Per comprendere meglio quali meccanismi potessero contribuire nella differente risposta dell'asse IIS dei ratti sottoposti a isolamento sociale, ho misurato i livelli plasmatici di CTS a tempi diversi dopo l'esposizione al foot-shock stress. In entrambi i gruppi sperimentali si osserva un aumento significativo dei livelli di CTS già 5 minuti dopo lo stress, ma, mentre i ratti di controllo raggiungono il picco della risposta allo stress dopo 15 minuti e dopo 60 minuti i livelli di CTS sono tornati ai livelli basali, nei ratti isolati il picco della risposta risulta slittato in avanti nel tempo rispetto ai controlli (60 minuti dopo lo stress) e i livelli di CTS restano significativamente alti ancora 7 ore dopo aver subito il foot-shock (Figura 12).



**Figura 12. Effetto del foot-shock stress sui livelli plasmatici di corticosterone dei ratti socialmente isolati.** I ratti sono stati stabulati singolarmente (isolati) o in gruppo (controlli), immediatamente dopo lo svezzamento, per 30 giorni. Dopo questo periodo gli animali sono stati sottoposti al foot-shock stress per 5 minuti e sacrificati a tempi diversi dopo l'inizio dello stress. I dati, espressi in percentuale verso i rispettivi valori basali, rappresentano la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. i rispettivi livelli basali; <sup>c</sup> $p < 0.05$  vs. il relativo tempo del gruppo di controllo.

### 3.3 Effetto dell'esposizione a due stress consecutivi sulla risposta dell'asse IIS dei ratti socialmente isolati

Per valutare se la prolungata risposta dell'asse IIS ad uno stress acuto nei ratti isolati potesse compromettere la risposta a stress successivi, ho misurato i livelli di CTS dopo aver sottoposto gli animali a due stress consecutivi. I ratti (controlli e isolati) sono stati sottoposti ad un primo foot-shock, e dopo 120 minuti riesposti al medesimo stress. Il sacrificio è avvenuto 30 minuti dopo lo stress. Negli animali di controllo l'esposizione a due stress consecutivi comporta un aumento del CTS plasmatico simile a quello osservato dopo il primo; i ratti isolati, invece, mostrano un aumento marcato della concentrazione plasmatica di CTS nella prima risposta, ma quando riesposti al foot-shock questo incremento è molto ridotto sia rispetto alla loro prima risposta che a quella del gruppo di controllo (Figura 13).



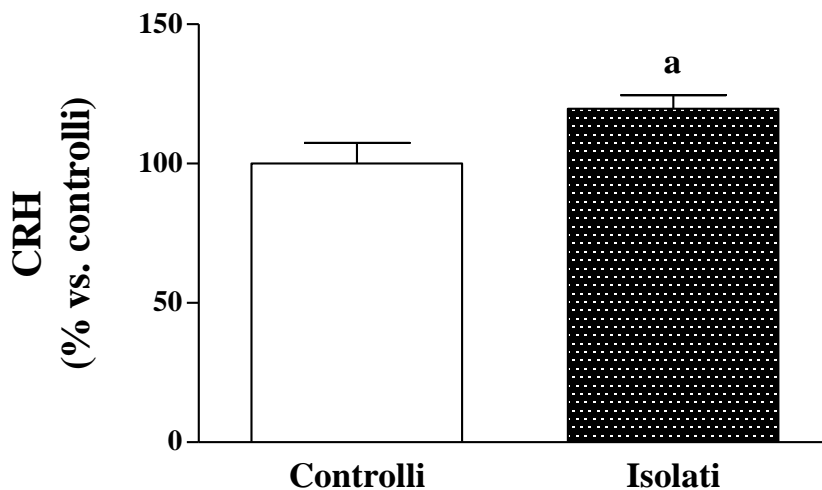
**Figura 13. Effetto dell'esposizione a due stress consecutivi sulla risposta dell'asse IIS dei ratti socialmente isolati.** Dopo 30 giorni di isolamento, gli animali (isolati e controlli) sono stati sottoposti a due stress consecutivi per misurare i livelli di corticosterone. Gli animali sono stati divisi in due gruppi: il primo è stato sottoposto al foot-shock e sacrificato dopo 30 minuti dall'inizio dello stress (FS 30 min), il secondo è stato sottoposto al foot-shock e dopo 120 minuti è stato riesposto al medesimo stress e sacrificato dopo 30 minuti dall'inizio del secondo stress (FS 30 + 120 min). I dati, espressi in percentuale verso i rispettivi livelli basali, rappresentano la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls. <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. i rispettivi livelli basali; <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs. la risposta al secondo stress del gruppo di controllo.



### 3.4 Effetto dell'isolamento sociale e dello stress acuto sui livelli ipotalamici dell'ormone di rilascio per la corticotropina (CRH)

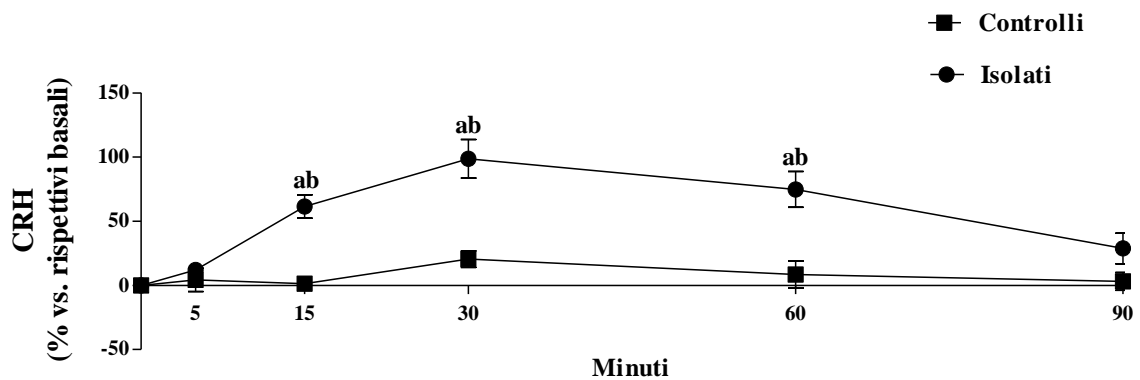
Dati precedentemente pubblicati mostrano come la somministrazione intracerebroventricolare di CRH induca un marcato incremento nei livelli plasmatici di corticosterone, sia nei ratti di controllo che in quelli sottoposti a isolamento sociale, ma questo effetto è significativamente maggiore nei ratti isolati (+121%) rispetto a quelli di controllo (+86%) (Serra *et al.*, 2005).

Partendo da questo risultato, ho misurato i livelli endogeni di CRH per capire se questo ormone potesse essere coinvolto nell'alterata risposta allo stress osservata nei ratti socialmente isolati. L'isolamento sociale induce un significativo aumento nei livelli basali di CRH in ipotalamo (+20%,  $p < 0.05$ ; Figura 14) rispetto agli animali di controllo.



**Figura 14. Effetto dell'isolamento sociale sui livelli ipotalamici di CRH.** Gli animali sono stati stabulati singolarmente (isolati) o 5 per gabbia (controlli) immediatamente dopo lo svezzamento, per 30 giorni, dopo i quali sono stati sacrificati per misurare i livelli basali ipotalamici di CRH. I dati, espressi in percentuale rispetto ai controlli, rappresentano la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls. <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. il gruppo di controllo.

Inoltre, il foot-shock induce un incremento significativo dell'ormone ipotalamico nei ratti isolati 15, 30 e 60 minuti dopo l'esposizione allo stress sia rispetto i propri valori basali (+62%, +99%, +75% rispettivamente,  $p<0.01$ ), sia rispetto l'incremento osservato nei ratti di controllo agli stessi tempi ( $p<0.05$ ; Figura 15).

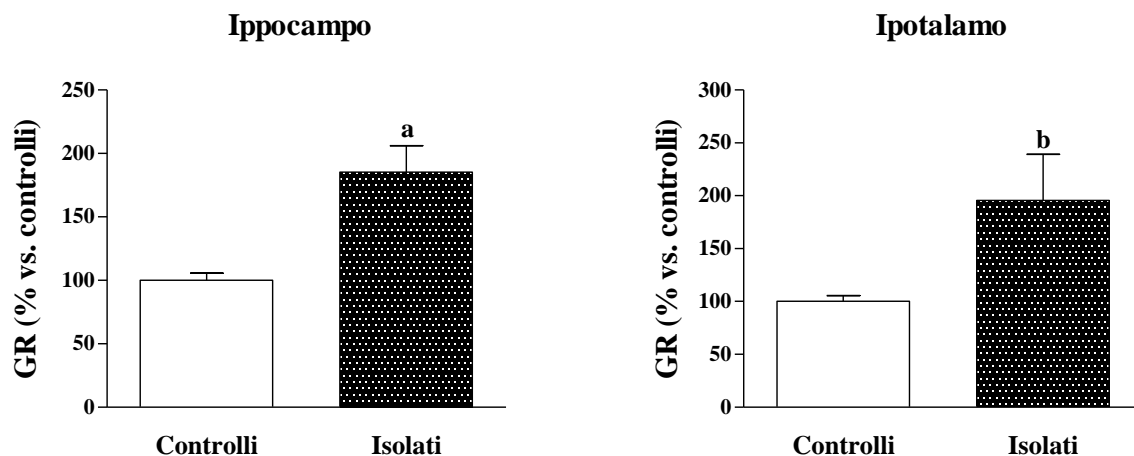


**Figura 15. Effetto dello stress acuto sui livelli ipotalamici di CRH.** Gli animali sono stati sottoposti a isolamento sociale per 30 giorni; i controlli sono stati tabulati in gruppo per lo stesso periodo di tempo, dopo il quale entrambi i gruppi sono stati sottoposti al foot-shock e sacrificati a tempi diversi dopo l'inizio dello stress. I dati, espressi in percentuale verso i rispettivi livelli basali, rappresentano la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls. <sup>a</sup> $p<0.01$ , vs. i rispettivi livelli basali; <sup>b</sup> $p<0.01$  vs. il corrispondente tempo del gruppo di controllo.

### 3.5 Effetto dell'isolamento sociale e del foot-shock stress sull'espressione ippocampale e ipotalamica dei recettori per i glucocorticoidi (GR)

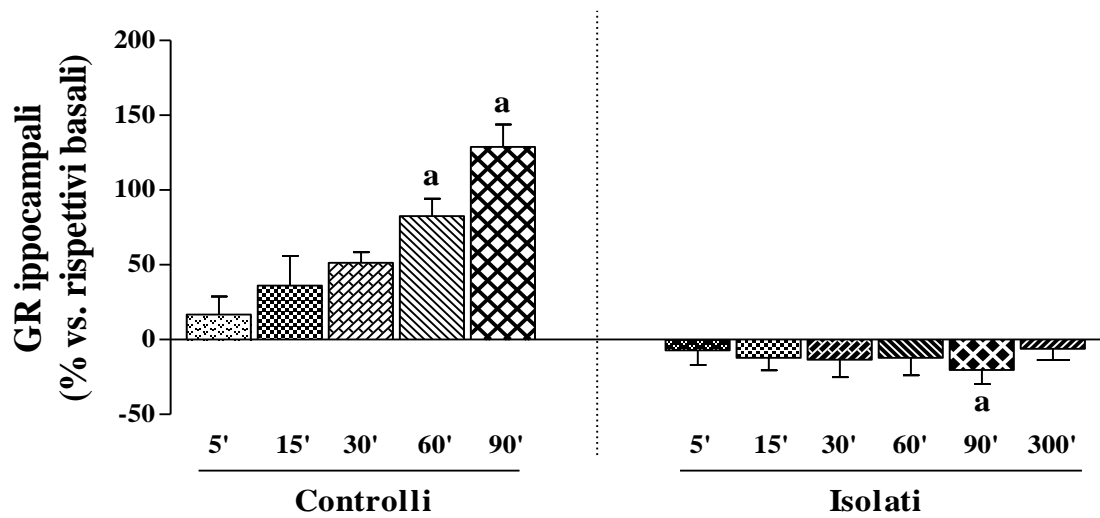
Ho misurato l'espressione dei recettori per i glucocorticoidi (GR) nell'ippocampo e nell'ipotalamo, aree principalmente coinvolte nella modulazione del feedback negativo dell'asse IIS, sia in condizioni basali che dopo aver sottoposto gli animali allo stress acuto.

Gli animali privati del contatto sociale con i conspecifici mostrano un significativo aumento dei livelli basali dei GR sia nell'ippocampo che nell'ipotalamo rispetto agli animali stabulati in gruppo (+85%,  $p < 0.01$  nell'ippocampo e +96%,  $p < 0.05$  nell'ipotalamo; Figura 16).



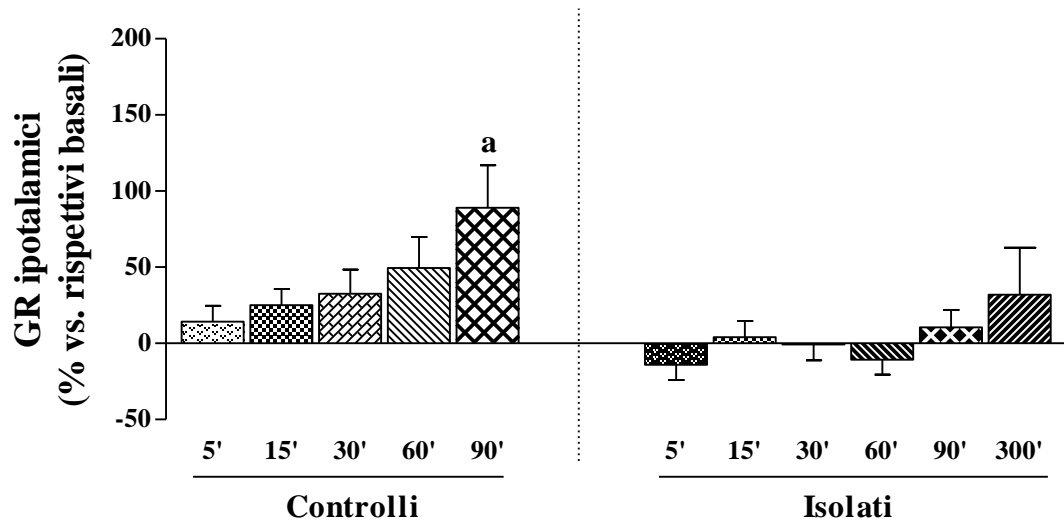
**Figura 16. Effetto dell'isolamento sociale sull'espressione dei recettori per i glucocorticoidi nell'ippocampo e nell'ipotalamo.** Gli animali sono stati stabulati singolarmente (isolati) o 5 per gabbia (controlli) immediatamente dopo lo svezzamento, per 30 giorni, dopo i quali sono stati sacrificati per misurare i livelli basali ippocampali e ipotalamici dei GR. I dati, espressi in percentuale verso i controlli, rappresentano la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls. <sup>a</sup> $p < 0.01$ , <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs. il gruppo di controllo.

Nell'ippocampo, al contrario dei ratti di controllo dove il foot-shock induce un progressivo aumento nel tempo dell'espressione dei GR, i ratti socialmente isolati mostrano una tendenza alla riduzione di questi recettori che risulta essere statisticamente significativa 90 minuti dopo l'esposizione allo stress acuto ( $p < 0.05$ ; Figura 17).



**Figura 17. Effetto del foot-shock stress sull'espressione dei GR ippocampali.** Gli animali sono stati stabulati singolarmente (isolati) o 5 per gabbia (controlli) immediatamente dopo lo svezzamento, per 30 giorni, dopo i quali sono stati sottoposti al foot-shock stress per 5 minuti e sacrificati a diversi tempi dopo l'inizio dello stress. I dati, espressi in percentuale verso i rispettivi livelli basali, rappresentano la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls. <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. i rispettivi livelli basali.

Analogamente, nell'ipotalamo il foot-shock non induce alcuna modificazione all'espressione dei livelli dei GR nei ratti socialmente isolati, mentre i controlli mostrano un andamento simile a quello osservato nell'ippocampo (Figura 18).

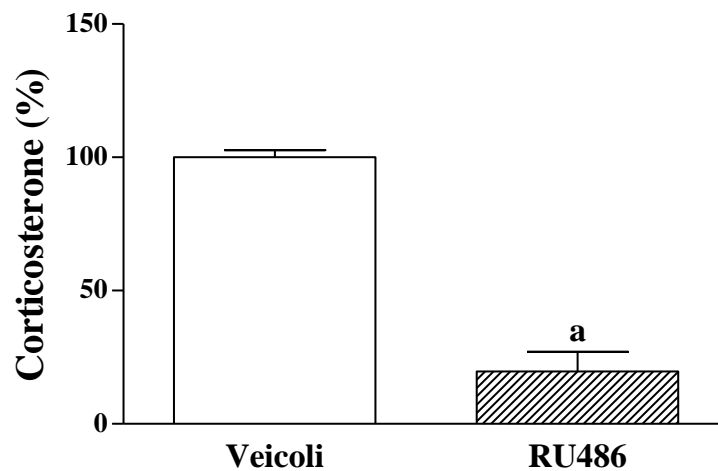


**Figura 18. Effetto del foot-shock stress sull'espressione dei GR ipotalamici.** Gli animali sono stati stabulati singolarmente (isolati) o 5 per gabbia (controlli) immediatamente dopo lo svezzamento, per 30 giorni, dopo i quali sono stati sottoposti al foot-shock stress per 5 minuti e sacrificati a diversi tempi dopo l'inizio dello stress. I dati, espressi in percentuale verso i rispettivi livelli basali, rappresentano la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls. <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. i rispettivi livelli basali.

### 3.6 Effetto del trattamento con Mifepristone (RU486) e dello stress acuto sui livelli plasmatici di corticosterone in animali di controllo

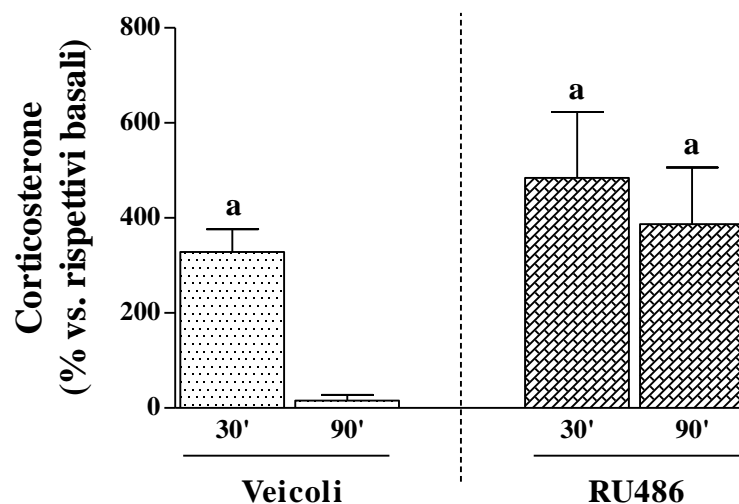
Per capire meglio il ruolo dei GR nella risposta allo stress del corticosterone, ho sottoposto un gruppo di animali di controllo al trattamento con Mifepristone (RU486), un antagonista non-selettivo dei GR. Un'ora dopo il trattamento, gli animali sono stati sottoposti al foot-shock e sacrificati 30 e 90 minuti dopo l'inizio dello stress.

Il blocco dei GR negli animali trattati con RU486 causa una riduzione significativa nei livelli plasmatici basali di corticosterone ( $-80\%$ ,  $p<0.01$ ; Figura 19) rispetto ai ratti trattati con il veicolo, un effetto simile a quello indotto dall'isolamento sociale.



**Figura 19. Effetto del trattamento con RU486 sui livelli plasmatici basali di corticosterone in ratti di controllo.** Gli animali di controllo dopo lo svezzamento sono stati tabulati 5 per gabbia. All'età di 50 giorni sono stati trattati con una soluzione contenente solo il veicolo o il farmaco RU486 e dopo 90 minuti sono stati sacrificati per misurare i livelli basali plasmatici di corticosterone. I dati, espressi in percentuale verso i controlli (veicoli), rappresentano la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls. <sup>a</sup> $p<0.01$  vs. il gruppo trattato col veicolo.

Quando sottoposti al foot-shock, i ratti trattati con la soluzione veicolante mostrano un incremento significativo dei livelli plasmatici di corticosterone 30 minuti dopo lo stress ( $p<0.01$ ); questi livelli tornano ai valori basali 90 minuti dopo aver subito lo stress. Al contrario, i ratti sottoposti a trattamento con RU486 mostrano un incremento molto più marcato dei livelli di CTS 30 minuti dopo l'esposizione al foot-shock ( $p<0.01$ ) rispetto agli animali trattati col veicolo e 90 minuti dopo lo stress questi livelli si mantengono significativamente elevati ( $p<0.01$ ; Figura 20). Questa risposta allo stress acuto è simile alla risposta steroidogenica osservata nei ratti socialmente isolati quando sottoposti al foot-shock.



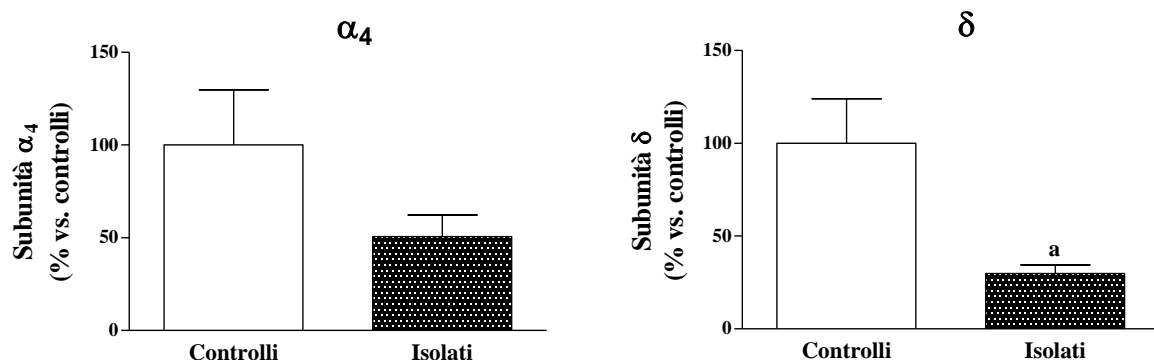
**Figura 20. Effetto dello stress acuto dopo trattamento con RU486 in ratti di controllo sui livelli plasmatici di corticosterone.** Gli animali di controllo dopo lo svezzamento sono stati tabulati 5 per gabbia. All'età di 50 giorni sono stati trattati con una soluzione contenente solo il veicolo o il farmaco RU486 e dopo 60 minuti sono stati sottoposti al foot-shock stress per 5 minuti e sacrificati 30 e 90 minuti dopo l'inizio dello stress. I dati, espressi come percentuale verso rispettivi valori basali, rappresentano la media  $\pm$  SEM di 8 animali per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls. <sup>a</sup> $p<0.01$  vs. i rispettivi livelli basali.

### 3.7 Effetto dell'isolamento sociale sull'espressione delle subunità alfa4 e delta del recettore GABA<sub>A</sub> nell'ipotalamo

Studi precedenti hanno dimostrato che l'isolamento sociale altera la trasmissione GABAergica attraverso la modificazione dell'espressione delle subunità del recettore GABA<sub>A</sub>. Infatti, nell'ippocampo dei ratti socialmente isolati è stato osservato un aumento dell'espressione basale delle subunità  $\alpha_4$  e  $\delta$ : questa composizione è caratteristica del recettore extrasinaptico e media la corrente tonica, che risulta coerentemente maggiore in quest'area (Serra *et al.*, 2006).

Al fine di capire se nell'alterazione della risposta allo stress osservata negli animali socialmente isolati potesse essere implicata anche la trasmissione GABAergica, ho voluto misurare l'espressione delle subunità  $\alpha_4$  e  $\delta$  anche nell'ipotalamo.

L'isolamento sociale induce una riduzione dell'espressione ipotalamica di entrambe le subunità (-49 e -70%,  $\alpha_4$  e  $\delta$  rispettivamente), che risulta però significativa solo per la  $\delta$  ( $p < 0.05$ ; Figura 21).



**Figura 21.** Effetto dell'isolamento sociale sull'espressione ipotalamica delle subunità  $\alpha_4$  e  $\delta$  del recettore GABA<sub>A</sub>. Gli animali sono stati stabulati singolarmente (isolati) o 5 per gabbia (controlli) immediatamente dopo lo svezzamento, per 30 giorni, dopo i quali sono stati sacrificati per misurare i livelli ipotalamici delle subunità  $\alpha_4$  e  $\delta$  del recettore GABA<sub>A</sub>. I dati, espressi in percentuale verso i controlli, rappresentano la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls. <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. il gruppo di controllo.

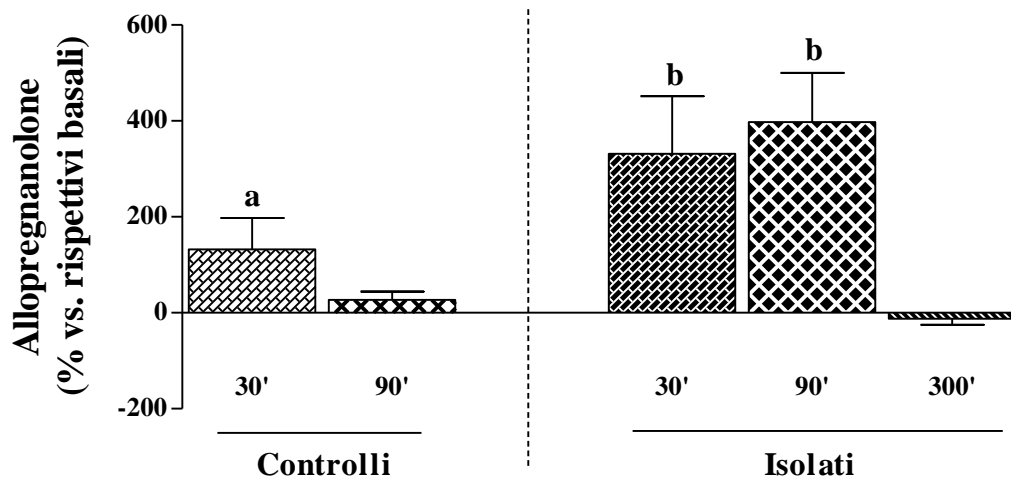


### **3.8 Effetto del foot-shock stress sui livelli plasmatici di allopregnanolone dei ratti socialmente isolati**

Come precedentemente dimostrato (*Serra et al., 2000*), l'isolamento sociale per 30 giorni subito dopo lo svezzamento riduce le concentrazioni di allopregnanolone (AP), il principale modulatore allosterico positivo della trasmissione GABA<sub>A</sub>ergica, in corteccia, ippocampo e plasma. Inoltre, il foot-shock stress induce un marcato aumento dei livelli di questo steroide in entrambi i gruppi sperimentali, ma la percentuale di incremento nei ratti socialmente isolati è significativamente maggiore rispetto a quella osservata nei ratti di controllo.

Negli ultimi anni si è sottolineata l'importanza del ruolo dell'AP nella regolazione dell'asse IIS (*Biggio et al., 2014; Brunton, 2015*). Per capire se le variazioni nelle concentrazioni di AP possano influenzare l'attività dell'asse IIS nella risposta allo stress, ho misurato i livelli plasmatici del neurosteroido a diversi tempi dopo aver sottoposto gli animali al foot-shock.

Come atteso (*Serra et al., 2000*), lo stress acuto induce un incremento nei livelli di AP plasmatici in entrambi i gruppi sperimentali che risulta però più marcato negli isolati (+132%,  $p < 0.05$  nei controlli e +331%,  $p < 0.01$  nei ratti isolati) 30 minuti dopo l'inizio dello stress (Figura 22).



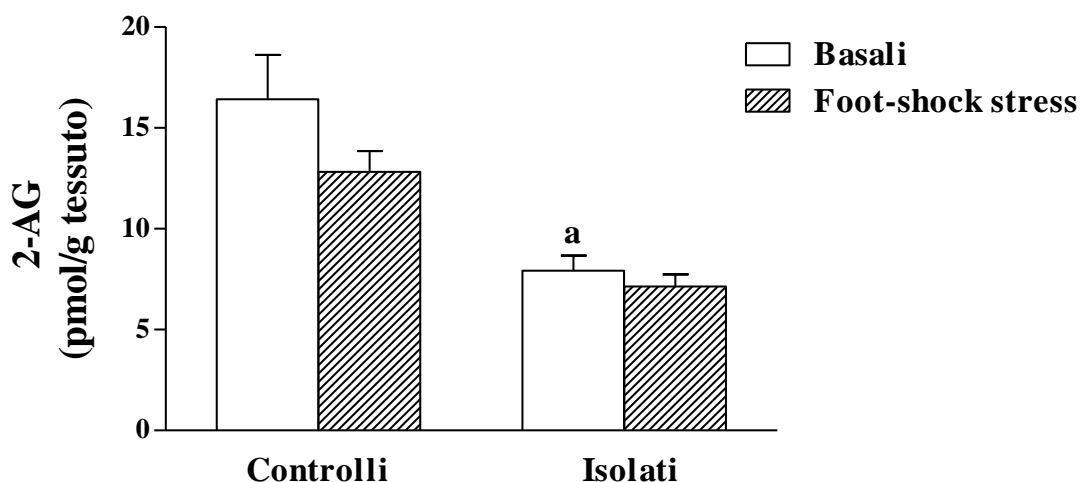
**Figura 22.** Effetto dell'esposizione ad uno stress acuto sui livelli plasmatici di allopregnanolone in ratti sottoposti a isolamento sociale. Gli animali sono stati stabulati singolarmente (isolati) o 5 per gabbia (controlli) immediatamente dopo lo svezzamento, per 30 giorni, dopo i quali sono stati sottoposti al foot-shock stress per 5 minuti e sacrificati a diversi tempi dopo l'inizio dello stress. I dati, espressi in percentuale verso i rispettivi valori basali, rappresentano la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls. <sup>a</sup> $p < 0.05$ . <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs. i rispettivi valori basali.

Mentre negli animali di controllo i livelli di AP tornano ai livelli basali 90 minuti dopo lo stress, negli animali socialmente isolati questi livelli si osservano ancora significativamente elevati allo stesso tempo ( $p < 0.01$ ) e risultano tornare ai valori di base solo 5 ore dopo l'inizio dello stress.

### 3.9 Effetto dell'isolamento sociale e dello stress acuto sul sistema endocannabinoide

Recentemente si è visto come il sistema endocannabinoide ricopra un ruolo funzionale nella regolazione dell'asse IIS (Hill *et al.*, 2010; Evanson *et al.*, 2010). Nell'ipotalamo il rilascio degli eCBs viene stimolato dal legame del CTS ai GR (Tasker e Herman, 2011). Sulla base dei precedenti risultati, in cui ho osservato un'alterazione nella secrezione di CTS e nell'espressione dei GR, ho voluto valutare, grazie alla collaborazione con il Prof. Sebastiano Banni, le concentrazioni ipotalamiche del 2-arachidonoilglicerolo (2-AG), il principale ligando endogeno dei recettori CB1 (Sugiura *et al.*, 2002).

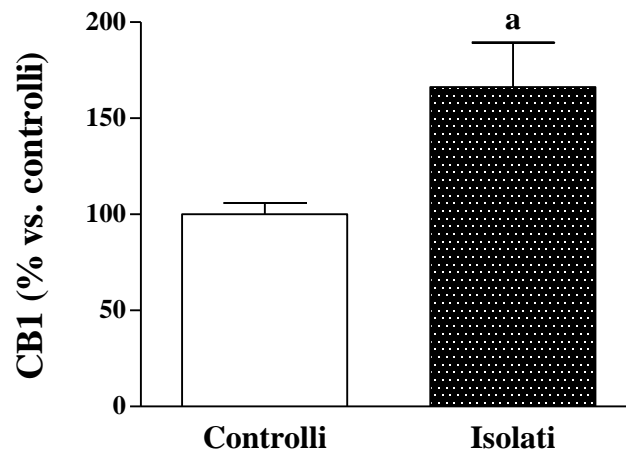
Negli animali socialmente isolati si osserva una riduzione significativa dei livelli basali ipotalamici del 2-AG (-52%,  $p < 0.01$ ) comparati ai livelli degli animali di controllo; il foot-shock non induce ulteriori modificazioni nei ratti isolati, mentre nei ratti di controllo si osserva una tendenza alla riduzione (-22%) di questo endocannabinoide che è coerente con altri studi (Patel *et al.*, 2005a; 2005b) (Figura 23).



**Figura 23. Effetto dello stress acuto sui livelli ipotalamici di 2-AG dei ratti socialmente isolati.** Gli animali sono stati stabulati singolarmente (isolati) o 5 per gabbia (controlli) per 30 giorni, dopo i quali sono stati sottoposti al foot-shock stress per 5 minuti e sacrificati 30 minuti dopo l'inizio dello stress. I dati, espressi in pmol/g di tessuto, rappresentano la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls. <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. i livelli basali del gruppo di controllo.

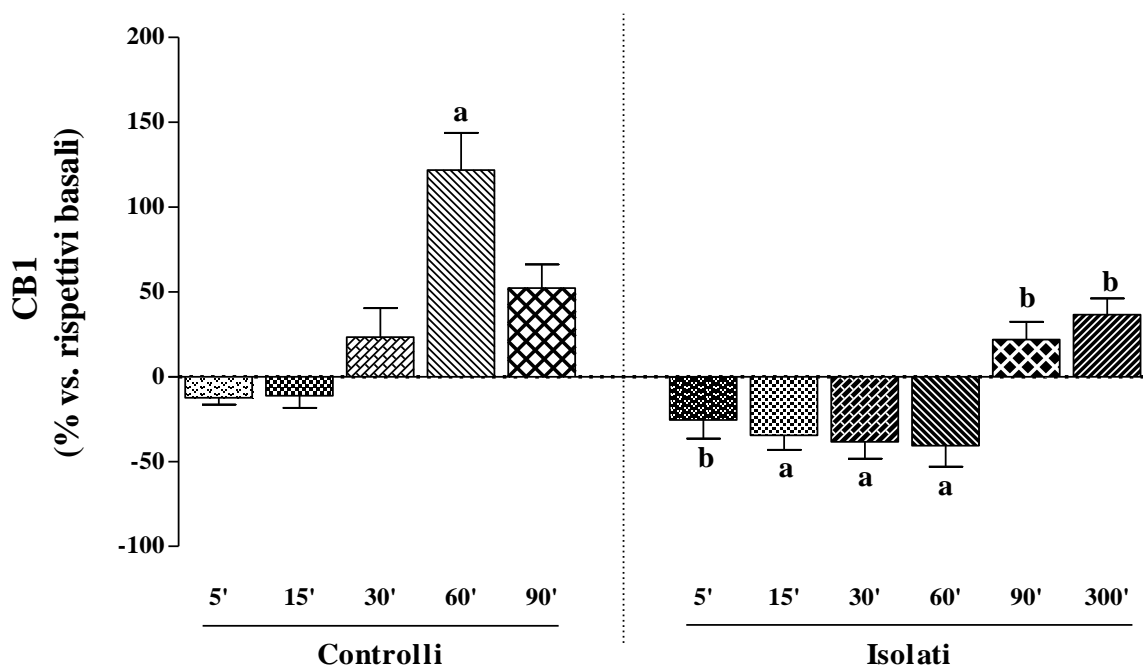
Una volta rilasciati, gli endocannabinoidi esplicano la loro funzione, attraverso un meccanismo retrogrado, legandosi ai recettori CB1 posti sul terminale presinaptico ed è noto dalla letteratura come l'espressione di questi recettori giochi un ruolo importante nell'attività dell'asse IIS (Hill *et al.*, 2010). Ho quindi misurato l'espressione di questi recettori nell'ipotalamo dei ratti socialmente isolati e in quelli di controllo.

L'isolamento sociale induce un incremento significativo (+66%,  $p < 0.01$ ; Figura 24) dei livelli basali dei recettori CB1 ipotalamici.



**Figura 24. Effetto dell'isolamento sociale sull'espressione dei recettori CB1 ipotalamici.** Gli animali sono stati stabulati singolarmente (isolati) o 5 per gabbia (controlli) per 30 giorni, dopo i quali sono stati sacrificati per misurare i livelli basali ipotalamici dei recettori CB1. I dati, espressi in percentuale verso i controlli (100%), rappresentano la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls. <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs. i ratti di controllo.

Dopo l'esposizione ad uno stress acuto come il foot-shock, negli animali di controllo si osserva un tendenza all'aumento (rispetto ai livelli basali) dell'espressione dei recettori CB1 ipotalamici a partire dai 30 minuti, fino a raggiungere il picco a 60 minuti (+121%,  $p<0.01$ ; Figura 25) e poi ridursi dopo 90 minuti. Al contrario, nei ratti isolati lo stress acuto induce una riduzione dei livelli di CB1 che risulta significativa (verso i rispettivi livelli basali) già 5 minuti dopo ( $p<0.05$ ) e si mantiene sino a 60 minuti dopo l'inizio dello stress ( $p<0.01$ ); successivamente l'espressione dei recettori CB1 aumenta significativamente (90 e 300 minuti dopo l'inizio dello stress) ( $p<0.05$ ; Figura 25).



**Figura 25. Effetto del foot-shock stress sull'espressione ipotalamica dei recettori CB1 dei ratti socialmente isolati.** Gli animali sono stati stabulati singolarmente (isolati) o 5 per gabbia (controlli) immediatamente dopo lo svezzamento, per 30 giorni, dopo i quali sono stati sottoposti al foot-shock stress per 5 minuti e sacrificati a diversi tempi dopo l'inizio dello stress. I dati, espressi in percentuale verso i rispettivi valori basali, rappresentano la media  $\pm$  SEM di 10 animali per gruppo sperimentale e sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls. <sup>a</sup> $p<0.01$ , <sup>b</sup> $p<0.05$  vs. i rispettivi livelli basali.

## Capitolo 4.

### Discussione

Coerentemente con dati ottenuti in pazienti affetti da depressione e tendenze suicide (*Keilp et al., 2015; McGirr et al., 2011; Lindqvist et al., 2008*), i miei risultati dimostrano che la separazione dai conspecifici per 30 giorni a partire dallo svezzamento induce nei ratti maschi una riduzione significativa dei livelli plasmatici basali di CTS. Questa riduzione è significativa sin dalla prima settimana di isolamento sociale e permane per tutto il periodo in cui i ratti restano stabulati in gabbie singole. In accordo con studi precedenti (*Serra et al., 2000; 2003; 2005*), lo stress cronico indotto dall'isolamento sociale rende gli animali più sensibili allo stress acuto rispetto ai ratti di controllo stabulati in gruppo. Gli studi precedenti avevano mostrato che l'esposizione al foot-shock induce nei ratti socialmente isolati un aumento dei livelli plasmatici di CTS molto più marcato rispetto ai ratti di controllo, suggerendo la presenza di un'alterazione dei meccanismi di risposta allo stress (*Serra et al., 2000; 2005*). L'iperattività dell'asse IIS è stata dimostrata dalla maggiore percentuale di incremento dei livelli plasmatici di CTS 30 minuti dopo l'inizio del foot-shock nei ratti isolati (*Serra et al., 2000*) e la disregolazione del feedback negativo dell'asse IIS era stata verificata con il test di soppressione del desametasone che induce una minor riduzione delle concentrazioni plasmatiche di CTS nei ratti socialmente isolati rispetto ai controlli (*Serra et al., 2005*).

I miei dati mostrano che, in risposta ad uno stress acuto come il foot-shock, le concentrazioni plasmatiche di CTS nei ratti socialmente isolati risultano statisticamente significative già dopo 5 minuti, raggiungono il picco dopo 60 minuti e si mantengono elevate ancora 7 ore dopo l'inizio dello stress. Nei ratti di controllo, i livelli di CTS sono significativi dopo 15 minuti, raggiungono il picco dopo 30 minuti e ritornano ai valori

basali 60 minuti dopo lo stress acuto. L'eccessiva e prolungata risposta allo stress osservata negli animali socialmente isolati è in accordo con una disregolazione nella funzionalità dell'asse IIS. L'incapacità dei ratti isolati di ripristinare le condizioni omeostatiche dopo uno stress acuto, compromette le risposte a successivi stress. Infatti, sottoponendo gli animali ad un secondo identico stress 120 minuti dopo il primo, si osserva che l'aumento dei livelli di CTS nei ratti isolati risulta minore rispetto a quello misurato nei controlli; questo effetto potrebbe essere dovuto all'incapacità da parte delle ghiandole surrenali di produrre una quantità sufficiente di CTS in risposta allo stimolo stressante, essendo questi livelli ancora elevati in seguito all'esposizione al precedente stress. Al contrario, i ratti di controllo rispondono in maniera identica a due stress consecutivi, probabilmente perché 120 minuti dopo il primo stress i livelli di CTS in questi animali sono già tornati ai livelli basali e di conseguenza l'asse IIS è pronto a rispondere a nuovi stimoli. L'incapacità di ripristinare le condizioni omeostatiche indotta dall'isolamento sociale è stata osservata anche in disturbi psichiatrici come la depressione e il disturbo post-traumatico da stress nell'uomo, dove esperienze traumatiche lasciano una traccia indelebile a livello dei sistemi neuroendocrini che risulta ancora presente a distanza di anni dallo stress subito (*Heim et al., 2002; 2004*). Altri studi dimostrano che elevati livelli di glucocorticoidi dovuti a stress ripetuti nel tempo sono implicati nel disturbo d'ansia e nella depressione maggiore (*Papadopoulou et al., 2015*). Inoltre, l'iperattività dell'asse IIS è una delle anomalie neuroendocrine più diffusa tra i pazienti affetti da depressione maggiore (*Chang et al., 2015*).

L'effetto esagerato dello stress acuto negli animali socialmente isolati sui livelli plasmatici di corticosterone è riconducibile ad un'alterazione del circuito a livello delle strutture centrali che controllano l'attività dell'asse IIS. Infatti, i miei dati mostrano che l'isolamento sociale induce un aumento significativo dei livelli basali ipotalamici di CRH.

Dopo aver sottoposto gli animali isolati al foot-shock, ho osservato un incremento dei livelli di questo ormone più marcato rispetto ai controlli. Dunque, negli animali isolati, gli elevati livelli di CRH in seguito a stress acuto potrebbero essere responsabili dell'aumentato rilascio di CTS. Coerentemente, è stato precedentemente dimostrato che i ratti socialmente isolati sono più sensibili all'effetto del CRH sul rilascio di CTS (*Serra et al., 2005*).

La differente secrezione ipotalamica dell'ormone CRH in seguito a stress suggerisce che negli animali socialmente isolati la regolazione dell'attività del neurone CRH sia alterata. Come noto, le aree principalmente coinvolte nella modulazione del feedback negativo rapido sono l'ippocampo, l'ipotalamo e l'amigdala (*Tasker et al., 2011*). A livello ippocampale, il CTS si lega agli MR e ai GR situati sui neuroni piramidali della CA1, stimolando e inibendo, rispettivamente, il rilascio di glutammato da parte di questi neuroni le cui afferenze raggiungono l'ipotalamo. I miei risultati mostrano che l'isolamento sociale induce un aumento dell'espressione dei GR ippocampali, ai quali il CTS si lega quando raggiunge concentrazioni molto elevate. L'aumento dei livelli basali dei GR nei ratti socialmente isolati è probabilmente il risultato di un meccanismo di compensazione in risposta ai prolungati livelli ridotti di CTS. Dopo l'esposizione al foot-shock, negli animali di controllo l'espressione del GR aumenta con il tempo e risulta ancora elevata 90 minuti dopo lo stress. È interessante osservare che l'espressione della proteina è massima quando i livelli di CTS sono tornati ai valori basali: questo incremento graduale nel numero di recettori potrebbe essere importante nello spegnimento della risposta allo stress. Al contrario, dopo lo stress acuto, negli animali isolati si osserva una tendenza alla riduzione dell'espressione dei GR a tutti i tempi esaminati.

Nell'ipotalamo si osserva lo stesso andamento. In quest'area i GR sono situati sui neuroni che secernono il CRH. Questo neurone è controllato da interneuroni GABAergici che



riducono la sua attività, questi a loro volta attivati dalle afferenze glutamatergiche ippocampali, e da interneuroni glutamatergici che stimolano direttamente il rilascio di CRH. I GR, attivati dal legame del CTS, stimolano la produzione e il rilascio degli endocannabinoidi. Questi, attraverso un meccanismo retrogrado, agiscono sugli interneuroni glutamatergici regolandone l'attività. Come già osservato nell'ippocampo, l'espressione basale dei GR ipotalamici degli animali sottoposti a isolamento sociale è significativamente maggiore rispetto a quella dei ratti stabulati in gruppo. Nei ratti di controllo, dopo il foot-shock, i GR aumentano gradualmente con il tempo e sono ancora significativamente elevati 90 minuti dopo lo stress; al contrario, negli animali isolati non si osservano variazioni nell'espressione del recettore a tutti i tempi esaminati. Questo differente effetto dello stress sull'espressione dei GR suggerisce che l'inattivazione della risposta allo stress nei ratti sottoposti a isolamento sociale potrebbe essere dovuta ad una disregolazione del segnale mediato da questi recettori. In accordo, gli animali di controllo trattati con mifepristone mostrano livelli plasmatici basali di CTS significativamente ridotti e l'esposizione allo stress acuto induce una risposta molto più marcata e più duratura rispetto a quella degli animali che hanno ricevuto la soluzione veicolante. Questa risposta steroidogenica, sia in condizioni basali che dopo stress acuto, è del tutto simile a quella osservata negli animali isolati. Sebbene questo antagonista non sia selettivo per i GR, questo risultato suggerisce che l'alterata risposta allo stress degli animali isolati potrebbe essere dovuta ad una riduzione della funzione dei GR.

Come sottolineato precedentemente, l'attività dei neuroni che rilasciano il CRH è tenuta sotto controllo da interneuroni GABAergici inibitori e glutamatergici eccitatori. La trasmissione glutamatergica nell'ipotalamo è regolata dal sistema endocannabinoide. Abbiamo dunque misurato i livelli ipotalamici di 2-AG, il principale ligando endogeno dei recettori CB1 a livello cerebrale. Come detto precedentemente, il legame del CTS ai GR

localizzati a livello del neurone che secerne il CRH stimola la sintesi e il rilascio degli eCBs che, attraverso un meccanismo retrogrado, si legano ai recettori CB1 posti sul terminale presinaptico glutamatergico, regolando così il rilascio del neurotrasmettitore e di conseguenza l'eccitabilità del neurone CRH. I risultati mostrano che in seguito ad isolamento sociale le concentrazioni basali di 2-AG sono significativamente ridotte. Questo risultato è in contrasto con dati presenti in letteratura che mostrano che lo stress (acuto e cronico) induce un aumento dei livelli di 2-AG nella corteccia prefrontale, amigdala e ippocampo (*Marsicano et al., 2002; Sciolino et al., 2010; Ford et al., 2011*), un aumento stimolato dal CTS. L'isolamento sociale induce una diminuzione dei livelli di CTS e questa riduzione è coerente con i livelli ridotti di 2-AG in questi animali. Negli animali di controllo il foot-shock induce una tendenza alla riduzione dei livelli di 2-AG 30 minuti dopo lo stress, coerentemente con altri studi effettuati sui topi (*Patel et al., 2005a; 2005b*). Al contrario, negli animali isolati non si osserva alcuna modificazione nelle concentrazioni del 2-AG dopo lo stress. In accordo con i livelli basali ridotti di 2-AG, nei ratti socialmente isolati si osserva, in condizioni basali, un aumento dell'espressione dei recettori CB1 nell'ipotalamo. Inoltre, la time course dell'espressione dei recettori CB1, sottolinea una differente regolazione di questi recettori in seguito allo stress. Infatti, negli animali di controllo si osserva un lento incremento nel tempo dei livelli di CB1, aumento che diventa significativo 60 minuti dopo lo stress; negli animali socialmente isolati l'espressione del recettore si riduce significativamente fino a 60 minuti, per poi aumentare a partire da 90 minuti dopo lo stress. Questi dati suggeriscono che l'isolamento sociale induce un'alterazione anche a livello del sistema endocannabinoide e di conseguenza, visto il suo ruolo nella regolazione della secrezione del glutammato, un'alterazione a carico della trasmissione glutamatergica. È dunque ipotizzabile che l'indebolimento del segnale mediato dal 2-AG si traduca in una riduzione del controllo inibitorio portando ad un

aumento della secrezione di glutammato che iperattiva il neurone CRH. Saranno necessari studi di elettrofisiologia per verificare questa ipotesi.

In condizioni fisiologiche il sistema GABAergico e glutamatergico sono in equilibrio tra loro: questo equilibrio è alterato dall'isolamento sociale. Gli studi precedenti hanno dimostrato che l'isolamento sociale riduce le concentrazioni di AP, il più potente modulatore allosterico positivo endogeno della trasmissione GABAergica, nella corteccia, nell'ippocampo e nel plasma, riducendo così la funzionalità del recettore GABA<sub>A</sub> (*Serra et al., 2000*). Inoltre, è stato dimostrato che nell'ippocampo dei ratti socialmente isolati l'espressione delle subunità  $\alpha_4$  e  $\delta$ , che formano il recettore GABA<sub>A</sub> extrasinaptico e mediano la conduttanza delle correnti toniche GABAergiche (*Nusser e Mody, 2002; Stell e Mody, 2002*) è aumentata (*Serra et al., 2006*). Nell'ipotalamo, coerentemente con altri autori (*Verkuyl et al., 2004*), i miei risultati mostrano che uno stress cronico come l'isolamento sociale induce una riduzione nell'espressione delle subunità  $\alpha_4$  e  $\delta$  del recettore GABA<sub>A</sub>. Inoltre, dati preliminari mostrano che anche in quest'area i livelli di AP sono ridotti dall'isolamento sociale (dati non mostrati). Questi risultati suggeriscono che le riduzioni ipotalamiche delle subunità  $\alpha_4$  e  $\delta$  e dei livelli di AP possano essere responsabili di una riduzione della trasmissione GABAergica in quest'area, e quindi, una riduzione dell'inibizione del tono GABAergico sul neurone che rilascia CRH. Questi dati sono in accordo con altri lavori in cui, attraverso studi di elettrofisiologia, è stato dimostrato che una riduzione dell'espressione ipotalamica della subunità  $\delta$  corrisponde ad una riduzione dell'inibizione tonica GABAergica sui neuroni CRH (*Sarkar et al., 2011*).

L'evidenza che il foot-shock induce un aumento dei livelli plasmatici di AP molto più marcato nei ratti isolati rispetto a quelli di controllo è in accordo con un tentativo di compensare la riduzione della trasmissione GABAergica.

In conclusione, i risultati della mia tesi costituiscono un punto di partenza nello studio dei microcircuiti responsabili della regolazione dell'asse IIS in un modello sperimentale di stress cronico come l'isolamento sociale. Ulteriori studi sono in corso per comprendere meglio questo circuito, a partire dal ruolo svolto dal sistema endocannabinoide nella disregolazione del feedback negativo mediato dai glucocorticoidi, il coinvolgimento di altre aree importanti come l'amigdala e la corteccia prefrontale, e la presenza di modificazioni epigenetiche nelle proteine che svolgono un ruolo chiave nella modulazione di questo sistema. Questi risultati potranno contribuire a capire meglio i meccanismi alla base delle alterazioni dell'asse IIS osservate anche in pazienti affetti da disturbi psichiatrici, portando così allo sviluppo di nuove terapie per l'uomo.

## Capitolo 5.

### Bibliografia

- Ader R, Friedman SB, 1965. Social Factors Affecting Emotionality and Resistance to Disease in Animals: V. Early Separation from the Mother and Response to a Transplanted Tumor in the Rat. *Psychosom. Med.*, 27(2), 119-122.
- Akana SF, Scribner KA, Bradbury MJ, Strack AM, Walker CD, Dallman MF, 1992. Feedback sensitivity of the rat hypothalamo-pituitary-adrenal axis and its capacity to adjust to exogenous corticosterone. *Endocrinology*, 131(2), 585-594.
- Akirav I, 2013. Cannabinoids and glucocorticoids modulate emotional memory after stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 37(10 Pt 2):2554-63.
- Anisman H, Zaharia MD, Meaney MJ, Merali Z, 1998. Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *Int. J. Dev. Neurosci.*, 16(3-4):149-64.
- Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP, 1996. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocrine Reviews*, 17(3), 245-261.
- Barbaccia ML, Roscetti G, Trabucchi M, Mostallino MC, Concas A, Purdy RH, Biggio G, 1996. Time-dependent changes in rat brain neuroactive steroid concentrations and GABA<sub>A</sub> receptor function after acute stress. *Neuroendocrinology* 63, 166-172.
- Barbaccia ML, Roscetti G, Trabucchi M, Purdy RH, Mostallino MC, Concas A, Biggio G., 1997. The effects of inhibitors of GABAergic transmission and stress on brain and plasma allopregnanolone concentrations. *Br. J. Pharmacol.*, 120(8):1582-8.
- Belelli D, Lambert JJ, 2005. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA<sub>A</sub> receptor. *Nat. Rev. Neurosci.*, 6(7):565-75.
- Benito C, Tolon RM, Pazos MR, Nunez E, Castillo AI, Romero J, 2008. Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, 153(2), 277-285.
- Biggio G, Concas A, Follesa P, Sanna E, Serra M. Stress, ethanol, and neuroactive steroids. *Pharmacol. Ther.*, 116(1):140-71.
- Biggio G, Pisu MG, Biggio F, Serra M, 2014. Allopregnanolone modulation of HPA axis function in the adult rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 231(17):3437-44.
- Binder EB, 2009. The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 34 Suppl. 1:S186-95.
- Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos AJ, Fernandez-Ruiz JJ, Di Marzo V, 1999. Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 256(2): 377-80.
- Brickley SG, Cull-Candy SG, Farrant M, 1996. Development of a tonic form of synaptic inhibition in rat cerebellar granule cells resulting from persistent activation of GABA<sub>A</sub> receptors. *J. Physiol. (Lond.)*, 497:753–759.
- Brown N, Kerby J, Bonnert TP, Whiting PJ, Wafford KA, 2002. Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human  $\alpha 4\beta 3\delta$  GABA<sub>A</sub> receptors. *Brit. J. Pharmacol.*, 136:965-974.
- Brunton PJ, 2015. Neuroactive steroids and stress axis regulation: Pregnancy and beyond. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, pii: S0960-0760(15)30040-6.

- Burkey TH, Quock RM, Consroe P, Ehlert FJ, Hosohata Y, Roeske WR, Yamamura HI, 1997. Relative efficacies of cannabinoid CB1 receptor agonists in the mouse brain. *Eur. J. Pharmacol.* 336(2-3):295-98.
- Campolongo P, Roozendaal B, Trezza V, Hauer D, Schelling G, McGaugh JL, Cuomo V, 2009. Endocannabinoids in the rat basolateral amygdala enhance memory consolidation and enable glucocorticoid modulation of memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(12), 4888-4893.
- Carrasco GA, Van de Kar LG, 2003. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol.*, 28;463(1-3):235-72.
- Castelli MP, Piras AP, Melis T, Succu S, Sanna F, Melis MR, Collu S, Ennas MG, Diaz G, Mackie K, Argiolas A, 2007. Cannabinoid CB1 receptors in the paraventricular nucleus and central control of penile erection: immunocytochemistry, autoradiography and behavioral studies. *Neuroscience*, 15;147(1):197-206.
- Chang HS, Won E, Lee HY, Ham BJ, Lee MS, 2015. Association analysis for corticotropin releasing hormone polymorphisms with the risk of major depressive disorder and the response to antidepressants. *Behav. Brain Res.*, 292:116-24.
- Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G, 2005. Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.*, 67, 259-284.
- Chen R, Lewis KA, Perrin MH, Vale WW, 1993. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(19), 8967-8971.
- Chrousos GP, Gold PW, 1992. The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama*, 267(9), 1244-1252.
- Concas A, Mostallino MC, Porcu P, Follesa P, Barbaccia ML, Trabucchi M, Purdy RH, Grisenti P, Biggio G., 1998. Role of brain allopregnanolone in the plasticity of gamma-aminobutyric acid type A receptor in rat brain during pregnancy and after delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(22):13284-9.
- Cone RD, Lu D, Koppula S, Vage DI, Klungland H, Boston B, Kesterson RA, 1995. The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent progress in hormone research*, 51, 287-317.
- Cottrell EC, Seckl JR, 2009. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 3.
- Dalrymple-Alford JC, Benton D, 1984. Preoperative differential housing and dorsal hippocampal lesions in rats. *Behav. Neurosci.*, 98(1):23-34.
- de Kloet ER, Reul JM, 1987. Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. *Psychoneuroendocrinology*, 12:83-105.
- de Kloet ER, Sibug RM, Helmerhorst FM, Schmidt MV, 2005. Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 29:271-281.
- de Kloet ER, Wallach G, McEwen BS, 1975. Differences in corticosterone and dexamethasone binding to rat brain and pituitary. *Endocrinology* 95:598–609.
- Deutsch DG, Ueda N, Yamamoto S, 2002. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 66(2), 201-210.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R, 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 18;258(5090):1946-9.

- Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG, 2003. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J. Neurosci.*, 23(12):4850-7.
- Dominguez R, Micevych P, 2010. Estradiol rapidly regulates membrane estrogen receptor alpha levels in hypothalamic neurons. *J. Neurosci.*, 30(38):12589-96.
- Einon DF, Morgan MJ, 1977. A critical period for social isolation in the rat. *Dev. Psychobiol.*, 10(2):123-32.
- Einon DF, Morgan MJ, 1977. A critical period for social isolation in the rat. *Dev. Psychobiol.*, 10(2):123-32.
- Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, Luscher B, 1998. Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the  $\gamma 2$  subunit and gephyrin. *Nat. Neurosci.*, 1(7):563-571.
- Evanson NK, Herman JP, 2015. Metabotropic glutamate receptor-mediated signaling dampens the HPA axis response to restraint stress. *Physiol. Behav.*, 150:2-7.
- Evanson NK, Tasker JG, Hill MN, Hillard CJ, Herman JP, 2010. Fast feedback inhibition of the HPA axis by glucocorticoids is mediated by endocannabinoid signaling. *Endocrinology*, 151(10), 4811-4819.
- Farrant M, Nusser Z, 2005. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat. Rev. Neurosci.*, 6(3):215-29.
- Felder CC, Briley EM, Axelrod J, Simpson JT, Mackie K, Devane W, 1995. Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(16):7656–60.
- Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggan RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW, 1996. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett.* 393(2-3): 231-5.
- Fénelon VS, Herbison AE, 1996. Plasticity in GABAA receptor subunit mRNA expression by hypothalamic magnocellular neurons in the adult rat. *J. Neurosci.*, 16, 4872-80.
- Follesa P, Biggio F, Caria S, Gorini G, Biggio G, 2004. Modulation of GABAA receptor gene expression by allopregnanolone and ethanol. *Eur. J. Pharmacology*, 500(1-3):413-25.
- Follesa P., Floris S., Tuligi G., Mostallino M.C., Concas A., Biggio G., 1998. Molecular and functional adaptation of the GABAA receptor complex during pregnancy and after delivery in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.*, 10(9):2905-12.
- Ford GK, Kieran S, Dolan K, Harhen B, Finn DP, 2011. A role for the ventral hippocampal endocannabinoid system in fear-conditioned analgesia and fear responding in the presence of nociceptive tone in rats. *Pain*, 152(11):2495-504.
- Glass M and Northup JK, 1999. Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. *Mol. Pharmacol.* 56(6):1362-9.
- Greenough WT, Black JE, Wallace CS, 1987. Experience and brain development. *Child. Dev.*, 58(3):539-59.
- Greenough WT, Black JE, Wallace CS. (1987). Experience and brain development. *Child Dev.*, 58(3):539-59.
- Grigoriadis DE, Liu XJ, Vaughn J, Palmer SF, True CD, Vale WW, Ling N, De Souza EB, 1996. 125I-Tyro-sauvagine: a novel high affinity radioligand for the

- pharmacological and biochemical study of human corticotropin-releasing factor 2 alpha receptors. *Mol. Pharmacol.*; 50(3):679-86.
- Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joëls M, 2011. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 350(2):299-309.
  - Gunn BG, Cunningham L, Mitchell SG, Swinny JD, Lambert JJ, Belelli D, 2014. GABAA receptor-acting neurosteroids: a role in the development and regulation of the stress response. *Front. Neuroendocrinol.*, 36:28-48.
  - Habib KE, Gold PW, Chrousos GP, 2001. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 30:695-728.
  - Hall FS, Humby T, Wilkinson LS, Robbins TW, 1997. The effects of isolation-rearing on preference by rats for a novel environment. *Physiol. Behav.*, 62(2):299-303.
  - Haller J, Mikics E, Makara GB, 2008. The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. *Front. Neuroendocrinol.*, 29:273-291.
  - Hamann M, Rossi DJ, Attwell D, 2002. Tonic and spillover inhibition of granule cells control information flow through cerebellar cortex. *Neuron*, 33:625–633.
  - Harrison NL, Majewska MD, Harrington JW, Barker JL, 1987. Structure-activity relationships for steroid interaction with the gamma-aminobutyric acid A receptor complex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 241(1):346-53.
  - Harro J, Kiivet RA, Lang A, Vasar E, 1990. Rats with anxious or non-anxious type of exploratory behaviour differ in their brain CCK-8 and benzodiazepine receptor characteristics. *Behav. Brain Res.*, 18;39(1):63-71.
  - Heim C and Nemeroff CB, 2001. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biological psychiatry*, 49.12 1023-1039.
  - Heim C and Nemeroff CB, 2002. Neurobiology of early life stress: clinical studies. *Seminars in clinical neuropsychiatry* No 7.
  - Heim C, Plotsky PM, Nemeroff CB, 2004. Importance of studying the contributions of early adverse experience to neurobiological findings in depression. *Neuropsychopharmacology*, 29(4):641-8.
  - Hellems KG, Benge LC, Olmstead MC, 2004. Adolescent enrichment partially reverses the social isolation syndrome. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 21;150(2):103-15.
  - Herman JP, Prewitt CM, Cullinan WE, 1996. Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. *Crit. Rev. Neurobiol.*, 10(3–4): 371–94.
  - Hill MN, McEwen BS, 2009. Endocannabinoids: The silent partner of glucocorticoids in the synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(12):4579-80.
  - Hill MN, McEwen BS, 2010b. Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 34:791–797.
  - Hill MN, McLaughlin RJ, Bingham B, Shrestha L, Lee TT, Gray JM, Viau V, 2010a. Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(20), 9406-9411.
  - Hill MN, McLaughlin RJ, Pan B, Fitzgerald ML, Roberts CJ, Lee TT, Karatsoreos IN, Mackie K, Viau V, Pickel VM, McEwen BS, Liu QS, Gorzalka BB, Hillard CJ, 2011. Recruitment of prefrontal cortical endocannabinoid signaling by glucocorticoids contributes to termination of the stress response. *J. Neurosci.*, 20;31(29):10506-15.



- Hillard CJ, Jarrahan A, 2000. The movement of N-arachidonylethanolamine (anandamide) across cellular membranes. *Chem. Phys. Lipids*, 108.1 123-134.
- Holson RR, Scallet AC, Ali SF, Turner BB, 1991. "Isolation stress" revisited: isolation-rearing effects depend on animal care methods. *Physiol. Behav.*, 49(6):1107-18.
- Horton WR, Chapman G, Meldrum BS, 1979. The convulsant action of hydrazides and regional changes in cerebral gamma-aminobutyric acid and pyridoxal phosphate concentrations. *J. Neurochem.* 33, 745-749.
- Hosie AM, Wilkins ME, da Silva HM, Smart TG, 2006. Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites *Nature*, 23;4444(7118):486-9
- Hrabovszky E, Wittmann G, Kalló I, Füzesi T, Fekete C, Liposits Z, 2012. Distribution of type 1 cannabinoid receptor-expressing neurons in the septal-hypothalamic region of the mouse: colocalization with GABAergic and glutamatergic markers. *J. Comp. Neurol.*, 520(5):1005-20.
- Ice GH, 2005. Factors influencing cortisol level and slope among community dwelling older adults in Minnesota. *J. Cross Cult Gerontol.*, 20(2):91-108.
- Jacobson L, Sapolsky R, 1991. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr. Rev.*, 12, 118–134.
- Joels M, de Kloet ER, 1994. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog. Neurobiol.*, 43(1):1-36.
- Joëls M, Karst H, DeRijk R, de Kloet ER, 2008. The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci.*, 31:1-7.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Watanabe M, 2009. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.*, 89(1):309-80.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Watanabe M, 2009. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.*, 89(1), 309-380.
- Karim A, Arslan MI, 2000. Isolation modifies the behavioural response in rats. *Bangladesh Med. Res. Counc. Bull.*, 26(1):27-32.
- Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schütz G, Joëls M, 2005. Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:19204-19207.
- Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T, Yoshida T, Miura E, Watanabe M, Ohno-Shosaku T, Kano M, 2006. The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J. Neurosci.*, 15;26(11):2991-3001.
- Keilp JG, Stanley BH, Beers SR, Melhem NM, Burke AK, Cooper TB, Oquendo MA, Brent DA, John Mann J, 2015. Further evidence of low baseline cortisol levels in suicide attempters. *J. Affect Disord.*, 190:187-192.
- Kim J, Alger BE, 2010. Reduction in endocannabinoid tone is a homeostatic mechanism for specific inhibitory synapses. *Nat. Neurosci.*, 13.5: 592-600.
- Kishimoto T, Pearse RV2nd, Lin CR, Rosenfeld MG, 1995. Asauvagine/corticotropin-releasing factor receptor expressed in heart and skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(4):1108-12.

- Kishimoto T, Radulovic J, Radulovic M, Lin CR, Schrick C, Hooshmand F, Spiess J, 2000. Deletion of CRHR2 reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nature genetics*, 24(4), 415-419.
- Kiss JZ, 1988. Dynamism of chemoarchitecture in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res. Bull.*, 20(6), 699-708.
- Koch MD, Arnold WJ, 1972. Effects of early social deprivation on emotionality in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 78(3):391-9.
- Koga D, Santa, T, Fukushima T, Homma H, Imai K, 1997. Liquid chromatographic-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric determination of anandamide and its analogs in rat brain and peripheral tissues. *J. Chromatogr. B. Sci. Appl.*, 690(1-2):7-13.
- Kostowski W, Czlonkowski A, Rewerski W, Piechocki T, 1977. Morphine action in grouped and isolated rats and mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 18;53(2):191-3.
- Lambert JJ, Belelli D, Hill-Venning C, Peters JA, 1995. Neurosteroids and GABAA receptor function. *Trends Pharmacol. Sci.*, 16(9):295-303.
- Levine S, Haltmeyer GC, Karas GG, Denenberg VH, 1967. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiology & Behavior*, 2(1), 55-59.
- Lewis M, Miller SM (eds), 1990. *Handbook of Developmental Psychopathology*. New York, Plenum Press, pp. 341-351. 82.
- Lindqvist D, Isaksson A, Träskman-Bendz L, Brundin L, 2008. Salivary cortisol and suicidal behavior--a follow-up study. *Psychoneuroendocrinology*, 33(8):1061-8.
- Linthorst AC, Flachskamm C, Barden N, Holsboer F, Reul JM, 2000. Glucocorticoid receptor impairment alters CNS responses to a psychological stressor: an in vivo microdialysis study in transgenic mice. *Eur. J. Neurosci.*, 12(1):283-91.
- Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, Kunos G, 2006. A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(36), 13345-13350.
- Liu XH, Zeng JW, Zhao YD, Chen PH, Xiao Z, Ruan HZ, 2008. Rapid inhibition of ATP-induced currents by corticosterone in rat dorsal root ganglion neurons. *Pharmacology*, 82:164-170.
- Lovenberg TW, Chalmers DT, Liu C, De Souza EB, 1995. CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology*, 136(9), 4139-4142.
- Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C, 2009. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 434-445.
- Majewska MD, 1992. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog. Neurobiol.*, 38(4):379-95.
- Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM, 1986. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*, 23;232(4753):1004-7.
- Malcher-Lopes R, Di S, Marcheselli VS, Weng FJ, Stuart CT, Bazan NG, Tasker JG, 2006. Opposing crosstalk between leptin and glucocorticoids rapidly modulates synaptic excitation via endocannabinoid release. *J. Neurosci.*, 26(24), 6643-6650.
- Marsicano G, Kuner R, 2008. Anatomical distribution of receptors, ligands and enzymes in the brain and the spinal cord: circuitries and neurochemistry. In: *Cannabinoids and the brain* (Kofalvi A. ed), pp 161-202, New York:Springer.

- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Lutz B, 2002. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*, 418:530–534.
- Matsumoto K, Uzunova V, Pinna G, Taki K, Uzunov DP, Watanabe H, Mienville JM, Guidotti A, Costa E, 1999. Permissive role of brain allopregnanolone content in the regulation of pentobarbital-induced righting reflex loss. *Neuropharmacology*; 38(7):955-63.
- McEwen BS, 2008. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur. J. Pharmacol.*, 583:174-185.
- McGirr A, Diaconu G, Berlim MT, Turecki G, 2011. Personal and family history of suicidal behaviour is associated with lower peripheral cortisol in depressed outpatients. *J. Affect Disord.*, 131(1-3):368-73.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminsky NE, Schatz AR, Gopher A, Almog , Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z, 1995. Identification of an endogenous monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.*, 50(1): 83-90.
- Meijer OC, De Lange EC, Breimer DD, De Boer AG, Workel JO, De Kloet ER, 1998. Penetration of Dexamethasone into Brain Glucocorticoid Targets Is Enhanced in *mdr1A* P-Glycoprotein Knockout Mice 1. *Endocrinology*, 139(4), 1789-1793.
- Mellon SH, Griffin LD, Compagnone NA, 2001. Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain research reviews*, 37(1), 3-12.
- Miller AH, Spencer RL, Pulera M, Kang S, McEwen BS, Stein M, 1992. Adrenal steroid receptor activation in rat brain and pituitary following dexamethasone: implications for the dexamethasone suppression test. *Biol. Psychiatry*, 32(10), 850-869.
- Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH, Tabira T, 2001. Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 26(5), 443-459.
- Mody I, 2001. Distinguishing between GABAA receptors responsible for tonic and phasic conductances. *Neurochem. Res.*, 26:907-913.
- Monory K, Massa F, Egertová M, Eder M, Blaudzun H, Westenbroek R, Kelsch W, Jacob W, Marsch R, Ekker M, Long J, Rubenstein JL, Goebbels S, Nave KA, Düring M, Klugmann M, Wölfl B, Dodt HU, Zieglgänsberger W., Wotjak CT, Mackie K, Elphick MR, Marsicano G, Lutz B, 2006. The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron*, 17;51(4):455-66.
- Morrow AL, Pace JR, Purdy RH, Paul SM, 1990. Characterization of steroid interactions with gamma-aminobutyric acid receptor-gated chloride ion channels: evidence for multiple steroid recognition sites. *Mol. Pharmacol.*, 37(2):263-70.
- Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD, 1992. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science*, 257:1248-1251.
- Moyer KE, Korn JH, 1968. Behavioral effects of isolation in the rat. *J. Genet. Psychol.*, 113 (2d Half):263-73.
- Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ, 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr. Rev.*, 5:25-44.
- Nusser Z, Mody I, 2002. Selective modulation of tonic and phasic inhibitions in dentate gyrus granule cells. *J. Neurophysiol.*, 87(5):2624-8.

- Nusser Z, Sieghart W, Somogyi P, 1998. Segregation of different GABAA receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *J. Neurosci.*, 18(5):1693-703.
- Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N, 2004. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J. Biol. Chem.*, 279:5298–305.
- O'Leary DD, Borngasser DJ, Fox K, Schlaggar BL, 1995. Plasticity in the development of neocortical areas. *Ciba Found Symp.* 193:214-30
- O'Leary JC 3rd, Zhang B, Koren J 3rd, Blair L, Dickey CA, 2013. The role of FKBP5 in mood disorders: action of FKBP5 on steroid hormone receptors leads to questions about its evolutionary importance. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, 12(8):1157-62.
- Owens MJ, Nemeroff CB, 1991. Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol. Rev.*, 43(4):425-73.
- Papadopoulou A, Siamatras T, Delgado-Morales R, Amin ND, Shukla V, Zheng YL, Kino T, 2015. Acute and chronic stress differentially regulate cyclin-dependent kinase 5 in mouse brain: implications to glucocorticoid actions and major depression. *Transl. psychiatry*, 5:e578.
- Patel S, Cravatt BF, Hillard CJ, 2005a. Synergistic interactions between cannabinoids and environmental stress in the activation of the central amygdala. *Neuropsychopharmacology* 30, 497–507.
- Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Hillard CJ, 2005b. Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling. *Eur. J. NeuroSci.*, 21:1057–69.
- Puia G, Santi MR, Vicini S, Pritchett DB, Purdy RH, Paul SM, Seeburg PH, Costa E, 1990. Neurosteroids act on recombinant human GABAA receptors. *Neuron.*, 4(5):759-65.
- Purdy RH, Morrow AL, Moore PH Jr, Paul SM, 1991. Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 15;88(10):4553-7.
- Reul JM, de Kloet ER, 1985. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*. 117(6):2505–2511.
- Reul JM, de Kloet ER, 1986. Anatomical resolution of two types of corticosterone receptor sites in rat brain with in vitro autoradiography and computerized image analysis. *J. Steroid. Biochem.*, 24:269-272.
- Reul JM, Gesing A, Droste S, Stec IS, Weber A, Bachmann C, Bilang-Bleuel A, Holsboer F, Linthorst AC, 2000. The brain mineralocorticoid receptor: greedy for ligand, mysterious in function. *Eur. J. Pharmacol.*, 405(1–3), 235–249
- Reul JM., Van den Bosch FR, De Kloet ER, 1987. Relative occupation of type-I and type-II corticosteroid receptors in rat brain following stress and dexamethasone treatment: functional implications. *J. Endocrinol.*, 115(3), 459-467.
- Rivier C, Vale WW, 1983. Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin- releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature*, 305:325-327.
- Robertson HA, Martin IL, Candy JM, 1978. Differences in benzodiazepine receptor binding in Maudsley reactive and Maudsley non-reactive rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 50(4):455-7.
- Russo SJ, Murrough JW, Han MH, Charney DS, Nestler EJ, 2012. Neurobiology of resilience. *Nature Neuroscience*, 15(11), 1475-1484.

- Sahakian BJ, Robbins TW, Iversen SD, 1977. The effects of isolation rearing on exploration in the rat. *Anim. Learning Behav.*, 5:193-198.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU, 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.*, 21:55-89.
- Saxena NC, Macdonald RL, 1996. Properties of putative cerebellar g-aminobutyric acid A receptor isoforms. *Mol. Pharmacol.*, 49:567-579.
- Schlicker E, Kathmann M, 2001. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 22(11):565-72.
- Sciolino NR, Bortolato M, Eisenstein SA, Fu J, Oveisi F, Hohmann AG, Piomelli D, 2010. Social isolation and chronic handling alter endocannabinoid signaling and behavioral reactivity to context in adult rats. *Neuroscience*, 168(2):371-86.
- Seeburg PH, Wisden W, Verdoorn TA, Pritchett DB, Werner P, Herb A, Lüddens H, Sprengel R, Sakmann B, 1990. The GABAA receptor family: molecular and functional diversity. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 55:29-40.
- Selye H, 1956. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 6:117-230.
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, 2003. GABA uptake regulates cortical excitability via cell type-specific tonic inhibition. *Nat. Neurosci.*, 6:484-490.
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA, 2004. Tonically active GABAA receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci.*, 27:262-269.
- Serra M, Mostallino MC, Talani G, Pisu MG, Carta M, Mura ML, Biggio G, 2006. Social isolation- induced increase in  $\alpha 4$  and  $\delta$  subunit gene expression is associated with a greater efficacy of ethanol on steroidogenesis and GABAA receptor function. *J. Neurochem.*, 98(1), 122-133.
- Serra M, Pisu MG, Floris I, Biggio G, 2005. Social isolation-induced changes in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the rat. *Stress*, 8(4), 259-264.
- Serra M, Pisu MG, Littera M, Papi G, Sanna E, Tuveri F, Biggio G, 2000. Social isolation- induced decreases in both the abundance of neuroactive steroids and GABAA receptor function in rat brain. *J. Neurochem.*, 75(2), 732-740.
- Silva-Gomez AB, Juárez I, Flores G, 2003. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical and hippocampal pyramidal neurons in postweaning social isolation rats. *Brain Res.*, 983(1), 128-136.
- Sinclair D, Fillman SG, Webster MJ, Weickert CS, 2013. Dysregulation of glucocorticoid receptor co-factors FKBP5, BAG1 and PTGES3 in prefrontal cortex in psychotic illness. *Sci. Rep.*, 18;3:3539.
- Smith GW, Aubry JM, Dellu F, Contarino A, Bilezikjian LM, Gold LW, Lee KF, 1998. Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron.*, 20: 1093-1102.
- Smith SM, Vale WW, 2006. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin. Neurosci.*, 8(4):383-95.
- Stell BM, Mody I, 2002. Receptors with different affinities mediate phasic and tonic GABA(A) conductances in hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, 22(10):RC223.
- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D, 1997. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 388(6644):773–778.

- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K, 1995. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 4;215(1):89-97.
- Sugiura T, Waku K, 2002. Cannabinoid receptors and their endogenous ligands. *J. Biochem.*, 132(1), 7-12.
- Sundstrom-Poromaa I, Smith DH, Gong QH, Sabado TN, Li X, Light A, Wiedmann M, Williams K, Smith SS, 2002. Hormonally regulated  $\alpha(4)\beta(2)\delta$  GABA(A) receptors are a target for alcohol. *Nat. Neurosci.*, 5(8):721-722.
- Swanson LW, 1991. Biochemical switching in hypothalamic circuits mediating responses to stress. *Prog. Brain Res.*, 87, 181–200.
- Tasker JG, Herman JP, 2011. Mechanisms of rapid glucocorticoid feedback inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Stress*, 14(4):398-406.
- Touma C, Gassen NC, Herrmann L, Cheung-Flynn J, Bull DR, Ionescu IA, Heinzmann JM, Knapman A, Siebertz A, Depping AM, Hartmann J, Hausch F, Schmidt MV, Holsboer F, Ising M., Cox MB, Schmidt U, Rein T, 2011. FK506 binding protein 5 shapes stress responsiveness: modulation of neuroendocrine reactivity and coping behavior. *Biol. Psychiatry*, 15; 70(10):928–936.
- Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J, 1981. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and betaendorphin. *Science*, 213:1394-1397.
- Veenema AH, 2009. Early life stress, the development of aggression and neuroendocrine and neurobiological correlates: what can we learn from animal models? *Front. Neuroendocrinol.*, 30(4), 497-518.
- Verkuyl JM, Hemby SE, Joëls M, 2004. Chronic stress attenuates GABAergic inhibition and alters gene expression of parvocellular neurons in rat hypothalamus. *Eur. J. Neurosci.*, 20(6):1665-73.
- Vernocchi S, Battello N, Schmitz S, Revets D, Billing AM, Turner JD, Muller CP, 2013. Membrane Glucocorticoid Receptor activation induces proteomic changes aligning with classical glucocorticoid effects. *Mol. Cell. Proteomics*, 12(7):1764-79.
- Wallner M, Hanchar HJ, Olsen RW, 2003. Ethanol enhances  $\alpha 4 \beta 3 \delta$  and  $\alpha 6 \beta 3 \delta \gamma$ -aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(25):15218-15223.
- Weinberger DR, 1987. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 44(7):660-9.
- Weiss IC, Feldon J, 2001. Environmental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia: a review. *Psychopharmacology (Berl)*, 156(2-3):305-26.
- Wiberger GS, Grice HC, 1963. Long-term isolation stress in rats. *Science*, 142(3591):507.
- Wongwitdech N, Marsden CA, 1996. Social isolation increases aggressive behaviour and alters the effects of diazepam in the rat social interaction test. *Behav. Brain Res.*, 75(1-2):27-32.
- Yen HC, Lu HH, Yuan PH, Wu HN, T'ang HC, 1958. Chlorpromazine and heat reducing measures in treatment of heat stroke. *Chin. Med. J.*, 77(2):174-7.

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Neuroscienze dell'Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2014/2015 - XXVIII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività 1.3.1 "Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali".